

Monoklonale Antikörper als Rezeptor-Analoga für die kombinatorische Chemie

Entwicklung und Evaluation des Konzeptes am Beispiel
von GPIIbIIIa-Rezeptor-Antagonisten

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

Von

Oliver Lack

aus Binningen (BL)

Basel, 2003

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Auf Antrag von:

Prof. Dr. Wolf-Dietrich Woggon,

Prof. Dr. Bernd Giese

Prof. Dr. Urs Séquin

Basel, den 2.4.2002

Prof. Dr. Marcel Tanner
Dekan der Philosophisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. W.-D. Woggon für sein Interesse, kritische Diskussionen und Anregungen und die mir gewährte Freiheit bei der Ausführung der Arbeit bedanken, sowie Dr. L. Weber, Prof. Dr. E. Roberts und W. Aschwanden, die mir die Durchführung der Arbeit bei der Hoffmann-La Roche ermöglichten.

Besonderer Dank gilt Dr. D. Schlatter, der mich während der gesamten Arbeit unterstützte und in dessen Labor bei der Hoffmann-La Roche AG ich meine Arbeit durchführen durfte.

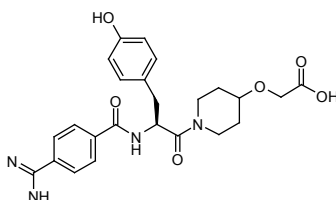
Des Weiteren möchte ich mich bei allen Beteiligten für Ihre Unterstützung bei meiner Arbeit bedanken, insbesondere bei E. Küng, der mir bei Arbeiten im Labor mit Rat und Tat zur Seite stand und bei Dr. W. Huber und Dr. A. Bubendorf und ihren Mitarbeiterinnen N. Beck, M.-C. Grunfelder und J. Kohler für BiaCore-Messungen und IR-Analysen sowie Diskussionen und Anregungen. Bei H. Zbinden möchte ich mich für seinen Einsatz bei der Fertigstellung der „Single-Bead“-MS-Analysen bedanken.

Ein Dank gebührt auch meiner Familie und meiner Frau Natalie, die durch Ihre Unterstützung und Geduld viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung und Evaluation eines Screeningansatzes für kombinatorische Festphasen-Bibliotheken mittels fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper sowie die Entwicklung und Optimierung einer Linkermethode zur massenspektrometrischen Untersuchung von Peptiden auf einzelnen Beads behandelt.

Der Antikörper, der gegen einen Antagonisten eines Rezeptors gezüchtet wurde, dient in einem Screening als Rezeptorersatz. Da er sozusagen ein Templat des Rezeptors darstellt, wird er als Screening-Werkzeug eingesetzt. Anhand von Lamifiban, einem GPIIb/IIIa-Rezeptor Antagonisten von Roche und des anti-Lamifiban monoklonalen Antikörpers LMF-2 wurde ein Screeningsystem für Substanzbibliotheken auf Festphase entwickelt und optimiert. Dieses wurde zur Selektion von aktiven Tetrapeptiden aus „Split & Mix“ – Bibliotheken sowie zur schrittweisen Optimierung von Lamifiban-Mimetika in Parallelsynthese benutzt. Ausserdem wurde die Qualität des Antikörper-Assays mit verschiedenen Substanzen unterschiedlicher Aktivität aus dem GPIIb/IIIa-Projekt validiert.



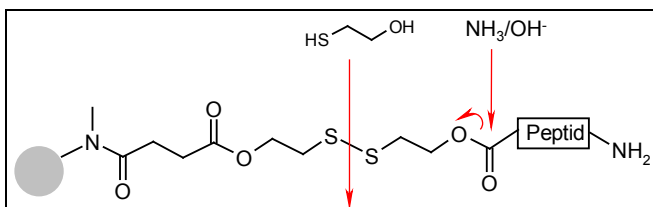
Lamifiban (RO-44-9883)

Mittels eines gegen Lamifiban gezüchteten monoklonalen Antikörpers, wurde anhand von drei Ansätzen das Prinzip, die Anwendbarkeit und Effizienz von einem Antikörper als Rezeptorersatz und Screeningwerkzeug evaluiert:

- Mit einem Antikörper-Screening-Assay wurden zehn Substanzen mit verschiedenen IC_{50} -Werten aus dem Lamifiban/GPIIb/IIIa-Projekt untersucht. Diese wurden an PEGA-Harz gebunden, mit fluoreszenzmarkiertem mAB inkubiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop und zugehöriger Bildbearbeitungssoftware analysiert. Danach wurden deren Leuchtintensitätswerte statistisch ausgewertet. Die Auswertung ergab eine gute Korrelationen mit den IC_{50} -Werten der Verbindungen gegenüber dem Rezeptor sowie mit den im BiaCore gemessenen K_D -Werten gegenüber den mAB. Mit dieser Untersuchung wurde der Nachweis erbracht, dass der monoklonale Antikörper LMF-2 Lamifiban und verwandte Verbindungen tendenziell in der gleichen Weise erkennt wie dies der GPIIb/IIIa-Rezeptor tut.
- Durch das Screening von Tetrapeptidbibliotheken auf Festphase, die in Split&Mix-Methodik hergestellt worden sind, sollten andere peptidische Inhibitoren für den GPIIb/IIIa-Rezeptor gefunden werden. Das erste Screening mit dem mAB und die darauffolgende Analyse mit Edman-Sequenzierung führte zu einigen kurzen Peptidsequenzen, welche im Milligrammasstab nachsynthetisiert wurden. Genauere Untersuchungen der Affinitäten dieser Peptide gegenüber dem Antikörper mittels BiaCore ergaben aber nur sehr schwache Bindungen (unterer mM Bereich). Auch im Rezeptortest zeigten die Peptide nur eine marginale Inhibition. Die aktivsten Peptide (His-Ile-Phe-Phe-Gly und His-Ile-Ile-Phe-Gly) zeigten einen IC_{50} -Wert von 2.6 mM gegenüber dem Rezeptor. Sie sind also ca. 700 Mal weniger aktiv als das natürliche Substrat RGDS ($IC_{50} = 3.7 \mu M$).

- Es wurde eine Synthesesequenz auf Festphase entwickelt, um Lamifiban-Analoga herzustellen und diese, analog zu den Peptiden, einzeln zu analysieren. Die „Single-Bead“-Analyse stellte sich aber als nicht durchführbar heraus, woraufhin wiederum eine statistische Auswertungsmethode zur Anwendung kam. Zur Optimierung des Lamifiban-Mimetika-Gerüsts wurde ein iterativer Ansatz gewählt, die verschiedenen Bausteine wurden also sequenziell optimiert und auf jeder Stufe mit monoklonalem Antikörper analysiert. Die nachträgliche Synthese der Substanzen in grösserem Masstab stellte sich jedoch als sehr schwierig heraus und die Produkte waren nicht stabil. Die Substanzen, deren Affinitäten gegen den Antikörper mittels BiaCore quantitativ gemessen wurden, zeigten nur eine niedrige Affinität gegenüber diesem. Die aktivste Verbindung wies einen K_D -Wert von 300 μM gegenüber dem mAB auf. Die statistischen Untersuchungen jeder einzelnen Variation zeigten aber tendenziell eine Übereinstimmung zwischen den aktiven Bausteinen mit den Bausteinen von Lamifiban, dem Hapten des Antikörpers.

Ein weiterer Teil der Arbeit beinhaltete die Analyse und Sequenzierung von kurzen Peptiden auf Festphasen-Beads. Dazu wurden verschiedene Linkersysteme (säurelabile Linker und Photolinker) verwendet und getestet, diese wurden aber für die „Single-Bead“-Analyse als untauglich befunden. Deshalb wurde eine Linker- und Abspaltungsmethode basierend auf einem Disulfidlinker entwickelt und optimiert, welche es erlaubte, reproduzierbare massenspektrometrische Analysen der Substanzen auf einem einzelnen Bead durchzuführen. Die Verbindungen werden in reduktivem oder basischem Medium über verschiedene Mechanismen vom Trägermaterial abgespalten (**Figur 1**).



Figur 1. Harz mit Disulfidlinker und Peptid. Die verschiedenen Spaltmechanismen sind angedeutet.

Verschiedene kurze Peptide (Tetra- bis Heptapeptide) konnten mit dieser Methode auf einzelnen Beads reproduzierbar analysiert, und deren Sequenz bestimmt werden. Zudem wurden verschiedene Variationen zur Optimierung der Linkersynthese direkt auf Festphase durchgeführt und mit Erfolg getestet.

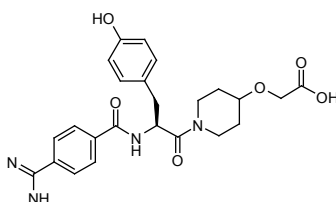
Das Konzept eines monoklonalen Antikörpers als Rezeptorersatz scheint zu funktionieren und es wurden Peptide und nicht peptidische Verbindungen identifiziert, die tatsächlich eine Affinität zum Antikörper und dem Rezeptor aufweisen. Ein noch zu lösendes Problem ist die grosse Variation/Standardabweichung der Leuchtintensitäten innerhalb der gleichen Beadsorte, woraus sich wegen der schmalen Bandbreite der verfügbaren Skala eine enorme Fehlerquelle ergibt. Das ist auch der Grund, weshalb diese Screening-Methode für Split&Mix-Bibliotheken problematisch ist. Die Lichtintensität eines einzelnen Beads ist nicht repräsentativ genug, um eine Aussage über die Aktivität der Substanz auf dem Bead zu machen.

Ein anderes Problem ist die Güte der verwendeten Reaktionen. Schon kleine Unterschiede in den Reaktionsumsätzen von Parallelreaktionen führen zu einer erheblichen Verfälschung des Resultates. Die verwendeten Reaktionen für diesen Ansatz sollten daher mit der Peptidchemie vergleichbare Umsätze aufweisen.

Summary

In the present work the development and evaluation of a screening assay for combinatorial libraries on solid-phase by means of fluorescence labelled monoclonal antibodies as well as the development and optimisation of a linker method for mass spectrometry of short peptides on one single bead is described.

In a screening-assay the antibody, which has been raised against an antagonist of a receptor serves as a substitution of the receptor. Since it represents sort of a template of the receptor it is utilised as a screening agent. On the basis of Lamifiban, a GPIIbIIIa-receptor antagonist from Roche, and the anti-Lamifiban monoclonal antibody LMF-2, a screening system for compound libraries on solid phase was developed and optimised. This was then employed for the selection of active tetrapeptides from Split&Mix-libraries as well as for the stepwise optimisation of Lamifiban-mimetics in Parallel Synthesis. Besides, the quality of the antibody-assay was validated with several compounds having varying activity from the GPIIbIIIa-project.



Lamifiban (RO-44-9883)

By means of three different approaches, using a monoclonal antibody that was raised against Lamifiban, the principle, the applicability and the efficacy of an antibody as a receptor substituent and as a screening tool was evaluated:

- Ten compounds with various IC_{50} -values descending from the Lamifiban/GPIIb/IIIa-project were examined with an antibody screening assay. The compounds were coupled onto PEGA resin, incubated with fluorescence labelled mAB and analysed with the fluorescence microscope and a suitable image processing software. Afterwards their light intensity values were analysed statistically. The statistical evaluation resulted in a good correlation with the IC_{50} -values of the compounds against the receptor as well as with the K_D -values measured with BiaCore. With this investigation the evidence was provided that the monoclonal antibody LMF-2 recognises Lamifiban and related compounds tendentially in the same manner as the GPIIb/IIIa receptor does.
- By the use of tetrapeptide libraries on solid phase which were produced with Split&Mix methodology, other peptide inhibitors for the GPIIb/IIIa-receptor were supposed to be found. The very first screening with the mAB and the subsequent analysis by Edman-sequencing led to some short peptide sequences which then were synthesised in milligramme scale. More thoroughly testing of the affinities of these peptides against the antibody by BiaCore resulted in only very weak binding (lower mM range). Also in the receptor-assay these peptides showed only a marginal inhibition. The most active peptides (His-Ile-Phe-Phe-Gly and His-Ile-Ile-Phe-Gly) showed a IC_{50} -value of 2.6 mM against the receptor. Thus they are appx. 700 times less active than the natural substrate RGDS ($IC_{50} = 3.7 \mu M$).
- A synthesis sequence on Solid Phase was developed to produce Lamifiban-analogues. The compounds should have been analysed individually, analogous to the peptides. However, the

Single-Bead-analysis turned out not to be realisable, whereupon a statistical evaluation method was applied. In order to optimize the Lamifiban-mimetics backbone, an iterative approach was chosen. The different building blocks were optimised sequentially and analysed with monoclonal antibody on each step. The subsequent synthesis of the compounds in a larger scale however proved to be very difficult and the products were not stable. The compounds whose affinity against the antibody was measured with BiaCore quantitatively, showed only a low affinity against the antibody. The most active compound showed a K_D -value of 300 μM . Yet, the statistical evaluation of each variation showed tendentially a match between the active building blocks and the building blocks of Lamifiban, the hapten of the antibody.

A further part of the work included the analysis and the sequencing of short peptides on solid-phase-beads. Therefore, different linker-systems (acid labile linkers and photolabile linkers) were utilised and tested. However, for Single-Bead analysis they were found to be unsuited. Thus a linker- and cleavage-method based on a disulfide linker was developed and optimised, which allowed doing reproducible mass spectrometric analysis of the compounds on one single bead. The cleavage of the compounds from the solid support over different mechanisms is achieved by treatment with basic or reductive media (**Figure 1**).

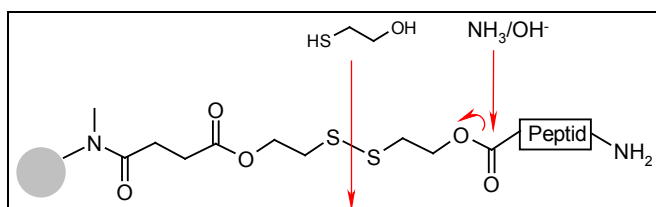


Figure 1. Resin with disulfide linker and peptide. The different cleavage mechanisms are indicated.

It was possible to reproducibly analyse several short peptides (tetra- up to heptapeptides) on single beads and to determine their sequences. Furthermore several variations for an optimisation of the linker synthesis directly on the solid support were realised and tested successfully.

The concept of a monoclonal antibody as a receptor substitution seems to work and indeed some peptides and non-peptide compounds were identified, which really have an affinity against the monoclonal antibody and the receptor.

However, the problem that will have to be solved is the big variation/standard deviation of the light intensities within the same bead-species. Due to the narrow bandwidth of the available scale, this leads to a considerable source of error. That is also the reason why this screening-method is problematic regarding to Split&Mix-libraries. The light intensity on one single bead is not representative enough to make a prediction about the compound on the bead.

Another problem is the quality of the utilised reactions. Even small differences in the turnover of the reaction lead to a substantial corruption of the result. Therefore, the utilised reactions for this approach should have turnovers comparable to those in peptide chemistry

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 5 |
| 1.1 Die Wirkstoffsuche - Chancen und Handicaps | 5 |
| 1.2 Der GPIIb/IIIa-Rezeptor | 6 |
| 1.3 Monoklonale Antikörper | 8 |
| 1.4 Kombinatorische Chemie | 10 |
| 1.4.1 Kombinatorische Chemie und Wirkstoffsuche | 11 |
| 1.4.2 Methoden in der Kombinatorischen Chemie | 12 |
| 1.4.3 Peptidchemie an der festen Phase | 14 |
| 1.4.3.1 Aktivierungs- und Kopplungsmethoden | 14 |
| 1.4.3.2 Schutzgruppenstrategien | 16 |
| 1.4.3.3 Linkerstrategien | 19 |
| 1.4.4 Prinzipielle Strategien in der kombinatorischen Chemie | 20 |
| 1.4.4.1 Die Parallel-Synthese | 20 |
| 1.4.4.2 Die „Split and Mix“-Methode – One Bead-One Structure – Selectide Process | 21 |
| 1.4.4.3 Selektionsprozesse für Split und Mix-Bibliotheken | 23 |
| 1.4.5 Analyse von trägergebundenen Substanzen | 24 |
| 1.4.5.1 Photolithographische Synthese von Bibliotheken | 25 |
| 1.4.5.2 Die „Phage Display“-Methode | 26 |
| 1.4.6 „Klassische“ Analysemethoden auf der festen Phase | 26 |
| 1.4.6.1 Massenspektrometrische Methoden | 27 |
| 1.4.6.2 ATR-Infrarot-Spektroskopie | 27 |
| 1.4.6.3 Magnetresonanz | 29 |
| 1.4.7 Identifikation von Peptidsequenzen mittels Edman-Abbau | 30 |
| 2. Problemstellung | 31 |
| 2.1 Konzept eines Screenings mit monoklonalen Antikörpern (mAB) als Rezeptorersatz | 31 |
| 2.2 Lamifiban und der anti-Lamifiban LMF-2-Antikörper | 31 |
| 2.2.1 Fluoreszenzmarkierung des LMF-2-Antikörpers | 33 |
| 2.3 Ansätze zur Untersuchung des Konzeptes | 34 |
| 2.3.1 PEGA-Harz und seine Eigenschaften | 36 |
| 3. Fest-Phasen-Assay mit fluoreszenzmarkiertem mAB | 37 |
| 3.1 Grundlagen der Fluoreszenz | 37 |
| 3.2 Anwendungen in der Wirkstoffsuche - FRET | 38 |
| 3.3 Physikalische Grundlagen für Absorptions-Assays | 40 |
| 3.4 Übertragung und Optimierung des Konzeptes auf Festphase | 41 |
| 4. Überprüfung des Konzeptes anhand von vorhandenen Antagonisten aus dem Lamifiban/GPIIb/IIIa-Projekt | 45 |
| 4.1 Test von vier GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten mit dem mAB-Assay | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2 Test von sechs weiteren GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten | 48 |
| 4.3 Die Skala der Lichtintensitätsmessung | 51 |
| 4.4 Fehlerquellen beim Antikörper-Assay | 51 |
| 5. Überprüfung des Konzeptes mittels Tetrapeptidbibliotheken auf Festphase | 53 |
| 5.1 Synthese der Tetrapeptidbibliothek | 53 |
| 5.2 Selektion mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem mAB | 54 |
| 5.3 Identifikation und Synthese von Peptidsequenzen | 54 |
| 5.4 Test der 10 Peptide gegen den GPIIb/IIIa Rezeptor | 56 |
| 5.5 Test der 10 Peptide gegen den mAB mittels BiaCore-Messung | 57 |
| 6. Entwicklung eines neuartigen Linkers für die Festphasensynthese und die massenspektrometrische Analyse von Peptiden auf einzelnen Beads | 59 |
| 6.1 Einleitung | 59 |
| 6.2 Synthese, Evaluation und Anwendung eines Disulfidlinkers | 62 |
| 6.2.1 Modifizierung des Fmoc-Peptidsynthese-Protokolls auf PEGA-Harz | 69 |
| 6.2.2 Verbesserung der Stabilität des Disulfidlinkers | 71 |
| 6.2.2.1 Einführung eines Sarcosin-Bausteins | 71 |
| 6.3 Synthese eines Disulfidlinkers auf Festphase | 73 |
| 6.3.1 Mitsunobu-Kopplung | 73 |
| 6.3.2 Sequenzielle Synthese des Linkers am PEGA-Harz | 73 |
| 6.3.3 Erhöhung der Beladung mittels Dendrimeren | 75 |
| 6.4 „Single-Bead“ MS Analyse | 77 |
| 6.4.1 Optimierte Bedingungen für die MS-Analyse | 78 |
| 6.4.2 Strukturbestimmung von Peptiden auf einzelnen Beads mit Tandem-MS („Single-Bead“ MS-Analyse) | 79 |
| 7. Synthese einer kombinatorischen Bibliothek zur Optimierung des Lamifiban-Grundgerüsts | 82 |
| 7.1 Evolutionäres Verfahren zur Optimierung eines Lamifibananaloga | 84 |
| 7.2 Auswahl der „Building Blocks“ | 86 |
| 7.3 Evaluation und Optimierung der Synthesesequenz | 93 |
| 7.3.1 Reduktion vom Nitril zum Amidin | 93 |
| 7.3.2 Michael-Addition (nucleophile Addition eines Alkoholats an Acrylsäure) | 99 |
| 7.3.2.1 Optimierung der Michael-Addition auf dem Harz | 99 |
| 7.3.2.2 Optimierung der Michael-Addition in Lösung | 103 |
| 7.4 Analyse der Reaktionssequenz „on-bead“ mit ATR-IR | 108 |
| 7.5 Synthese und Screening der Verbindungsbibliotheken auf der Basis eines evolutionären Ansatzes | 111 |
| 7.5.1 Optimierung des Amidinobenzoesäure-Bausteins | 111 |
| 7.5.2 Optimierung des Aminosäure-Bausteins | 115 |
| 7.5.3 Optimierung des Aminoalkohol-Bausteins | 118 |

| | |
|---|------------|
| 7.5.4 Optimierung des Acrylsäure-Bausteins | 121 |
| 7.6 Überprüfung der Resultate des Festphasenscreenings | 123 |
| 7.6.1 Selektion und Synthese einiger Verbindungen für weitere Untersuchungen | 123 |
| 7.6.2 Messung der Affinitätskonstanten der nachsynthetisierten Verbindungen gegenüber dem mAB mittels BiaCore | 128 |
| 8. Fazit und Ausblick | 131 |
| 9. Experimentelles | 133 |
| 9.1 Allgemeine Bemerkungen | 133 |
| 9.2 Abkürzungen: | 133 |
| 9.3 Substanzen | 133 |
| 9.4 Puffer | 134 |
| 9.5 Geräte und Apparaturen | 134 |
| 9.6 Chromatographische Methoden | 134 |
| 9.7 Spektroskopische Methoden | 136 |
| 9.8 Affinitätsmessungen | 137 |
| 9.9 Biochemische Methoden | 138 |
| 9.10 Fluoreszenzmarkierung des LMF-1 mAB | 138 |
| 9.11 SPPS Protokolle | 139 |
| 9.12 Kopplung von Substanzen aus dem Lamifiban-Projekt auf PEGA-Harz | 140 |
| 9.13 Synthese der zehn Tetrapeptide aus dem Screening der Split & Mix-Bibliotheken | 141 |
| 9.14 Synthese des Disulfidlinkers in Lösung | 142 |
| 9.15 Synthese eines Disulfidlinkers direkt auf Festphase | 146 |
| 9.16 Dendrimerisierung von PEGA-Harz (35 – 37) | 150 |
| 9.17 Bereitstellung der Boc-geschützten Aminoalkohole | 152 |
| 9.18 Optimierung der Reduktion vom Nitril zum Amidin | 157 |
| 9.18.1 Reduktion von an Harz gebundenem Benzonitril zum Benzamidin | 157 |
| 9.18.2 Reduktion von Benzonitril zu Benzamidin | 158 |
| 9.19 Herstellung von Benzamidinen mittels der Pinner-Methode | 158 |
| 9.19.1 Reduktion von Benzonitril zu subst. Benzamidinen 59 - 70 durch Pinnermethode am Harz | 160 |
| 9.20 Optimierung der Michael-Addition von N-Boc-Aminoalkoholen an Acrylsäuren/-amide | 161 |
| 9.21 Reaktionssequenz 81 → 87 , 91 → 97 | 163 |
| 9.22 Syntheseschritte der Lamifiban-Analoga-Bibliothek: | 165 |
| 9.23 Synthese der Bibliotheken im Rahmen eines evolutionären Ansatzes | 167 |
| 9.23.1 Synthese der 1. Bibliothek und Variation des Amidin-Bausteins | 167 |

| | |
|--|------------|
| → Bibliotheken A, B, C und D | 167 |
| 9.23.2 Synthese der 2. Bibliothek und Variation des Aminosäure-Bausteins | 168 |
| → Bibliotheken E und F | 168 |
| 9.23.3 Synthese der 3. Bibliothek und Variation des Aminoalkohol-Bausteins | 170 |
| → Bibliotheken G und H | 170 |
| 9.23.4 Synthese der 4. Bibliothek und Variation des Acrylbausteins | 172 |
| → Bibliotheken I und J | 172 |
| 9.24 Synthese einiger „aktiver“ Verbindungen aus dem Screening | 173 |
| 10. Literaturverzeichnis | 185 |

1. Einleitung

1.1 Die Wirkstoffsuche - Chancen und Handicaps

Die Wirkstoffsuche in der Pharmaindustrie hat sich in den letzten Jahren wesentlich verändert. Dank technisch unterstützten schnelleren Verfahren zur Synthese von Verbindungen ist es mit Hilfe der kombinatorischen Chemie und Parallelchemie möglich, umfassende Substanzbibliotheken durch Modifikation eines festen Grundgerüsts („backbone“) in sehr geringer Zeit herzustellen um so, nach einem für die jeweilige Anwendung geeigneten Bindungstest („Screening“) eine Leitstruktur („lead structure“, „lead“) zu finden, die dann wiederum mittels kombinatorischer Verfahren oder aber auch klassischer Chemie verfeinert wird. Auch das computergestützte Design von Verbindungen hat in den letzten Jahren dank enormen Steigerungen in den Rechnerleistungen einen grossen Aufschwung erfahren. Sofern die Struktur des biologischen Zielmoleküls („Target“) bekannt ist, ist es möglich, mit Molekülmodellierungsmethoden („Molecular Modelling“) Moleküle zu kreieren, die für die jeweiligen Anwendungen gewünschte Eigenschaften aufweisen, wie beispielsweise eine hohe Affinität zu einem biologischen Rezeptor, eine bestimmte Lipophilizität, ein definiertes Molgewicht u.s.w.. So können u.a. Grundgerüste für ein (hypothetisch) pharmakologisch wirksames Molekül, einen potentiellen Agonisten oder Antagonisten modelliert werden, die alsdann mittels kombinatorischer Methoden variiert und optimiert werden können. Da aber auch heute das Gebiet der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) noch nicht vollständig verstanden ist und nicht alle Faktoren, die eine aktive Verbindung ausmachen, durch Computerprogramme simuliert werden können, basiert die Suche nach neuen Wirkstoffen immer noch zum grössten Teil auf empirischen Methoden. Entscheidend für den „Output“ an Leitstrukturen ist deshalb nach wie vor die Anzahl und die Qualität der in geeigneten biologischen Testsystemen geprüften Verbindungen.

Jede Einzelne dieser Verbindungen muss also, um eine Verfeinerung des Grundgerüsts nicht zu verzögern, so schnell wie möglich am biologischen „Target“, in einem Rezeptortest auf ihre biologische Aktivität getestet werden. Auch im Screening werden Automaten und Roboter immer wichtiger und es sind grosse Bemühungen im Gange, HTS- („High-Throughput-Screening“) Systeme zu entwickeln, die grosse Mengen von Verbindungen im Hinblick auf ihre Eignung als Leitsubstanz für neue pharmazeutische Produkte testen. Diese Systeme sind aber grösstenteils noch in Entwicklung und nicht uneingeschränkt einsetzbar, da neben Schwierigkeiten mit den biologischen Zielmolekülen (Rezeptoren, Proteasen oder Kinasen; deren Isolierung, Kristallisation und Strukturaufklärung, Assayentwicklung) auch Probleme technischer Art auftreten (erhöhte Verdunstung, unerwünschte Kapillareffekte, Schwierigkeiten beim Mischen, Löslichkeitsprobleme, Temperaturschwankungen usw.). Diese treten auf, da um der grossen Menge Substanzen Herr zu werden, mit sehr kleinen Volumina und kleinen Reaktionsgefässen gearbeitet werden muss. Alle diese Faktoren beeinträchtigen die Güte und Reproduzierbarkeit der erhaltenen Daten. Das Screening der Substanzen ist somit der zeitliche und qualitative Engpass in der effizienten Wirkstoffsuche.

Um das Problem des langwierigen „Screenings“ zu umgehen, sind momentan bei allen pharmazeutischen Unternehmungen erhebliche Anstrengungen im Gange, neue, schnellere aber ebenso verlässliche Methoden zu entwickeln, die Unmengen von Verbindungen auf etwaige biologische Aktivität zu testen, sowie neue schnelle und effiziente Assays für die bestehenden Screeningsysteme zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit wird ein neuer Ansatz zur Identifizierung von aktiven Verbindungen beschrieben und am System des GPIIb/IIIa-Rezeptors untersucht. Hierbei dient ein fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper (mAB) als Ersatz für den biologischen Rezeptor. Die Voraussetzung dabei ist, dass bereits ein potentes am Rezeptor bindendes Substrat (natürliches Substrat oder synthetische Verbindung) bekannt und isoliert ist. Gegen dieses Substrat wird dann ein monoklonaler Antikörper gezüchtet. Dieser Antikörper dient, nachdem er mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert worden ist, als Screening-Werkzeug für mittels Split&Mix-Technik hergestellte Verbindungen. Das „Screening“ wird direkt auf den Beads durchgeführt und die „aktiven“ Beads werden separiert. Der mAB dient dabei sozusagen als Templat des Rezeptors. Nun müssen nur noch die separierten Verbindungen analysiert und nachsynthetisiert werden, um auf dem biologischen Rezeptor oder dem Antikörper getestet zu werden.

1.2 Der GPIIb/IIIa-Rezeptor

Adhäsions-Reaktionen lösen im Körper einige wichtige Zellfunktionen aus, die bestimmte physiologische Prozesse wie Zellmigration, –vermehrung und –differenzierung kontrollieren. Adhäsion kann durch Zell–Zell–, oder Matrix-Zell-Wechselwirkungen ausgelöst werden. Der Glycoproteinrezeptor GPIIb/IIIa (GP für Glycoprotein, IIb/IIIa für die Zusammensetzung aus einer α 2b- und einer β 3-Kette) gehört zu einer Familie von Zelloberflächen-Adhäsions-Rezeptoren, den Integrinen ¹ (**Figur 2**). Integrine sind eine grosse Gruppe membranständiger Rezeptoren, die auf allen Zelloberflächen, mit Ausnahme der Erythrocyten, vorkommen und mit allen Schlüsselproteinen der extrazellulären Matrix (z.B. Kollagene, Laminine, Fibronectin, Vitronectin) wechselwirken. Es sind heterodimere Rezeptoren, die nichtkovalent aus einer α - und einer β -Kette aufgebaut sind, wobei bisher 17 α - und 8 β -Ketten bekannt sind ². Aus der Vielfalt der resultierenden möglichen Kombinationen sind erst 20 näher charakterisiert, wobei von den meisten Rezeptoren die genaue Spezifität noch unbekannt ist. Integrine scheinen eine tragende Rolle bei Krankheiten zu spielen und wurden in Gebieten wie Thrombose, Entzündungen, Angiogenesis, und Osteoporose intensiv untersucht ^{3, 4, 5}. Von enormer Bedeutung ist dabei das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, auch bekannt unter dem Namen GPIIb/IIIa.

Der membrangebundene GPIIb/IIIa-Rezeptor vermittelt im Falle einer Aktivierung die Adhäsion der Blutplättchen, die Thrombocytenaggregation, durch die Bindung von Fibrinogen an die GPIIb/IIIa-Rezeptoren zweier Blutplättchen. Dadurch werden die Blutplättchen quervernetzt und die Blutgerinnung kann ausgelöst werden. Aktiviert wird der Rezeptor durch Stimulation von verschiedenen Agonisten wie Thromboxan, ADP, Thrombin oder Epinephrin. Dabei wird die Konformation des Glycoproteins geändert und der Rezeptor kann an Fibrinogen binden. Es gibt einige Proteine, die mit dem GPIIb/IIIa-Rezeptor wechselwirken, beispielsweise Fibronectin, Vitronectin, Typ I Kollagen, der von Willebrand Faktor und Fibrinogen ^{6, 7, 8}. Auch Flavoridine, eine Familie von peptidisch aufgebauten Schlangengiften („snake venom proteins“) sind potente Inhibitoren der Blutplättchenaggregation.

Es wird angenommen, dass ein verstopfender Thrombus gebildet wird, wenn sich Blutplättchen auf beschädigtes Endothel anlagern. Diese „Monolayers“ dienen als Basis für das Wachstum eines Thrombus, der zu einer Reduktion der Blutzirkulation führen kann ⁹. Eine sehr hohe Anzahl von ca. 50'000 - 80'000 GPIIb/IIIa-Molekülen befindet sich auf der Oberfläche eines Blutplättchens ¹⁰.

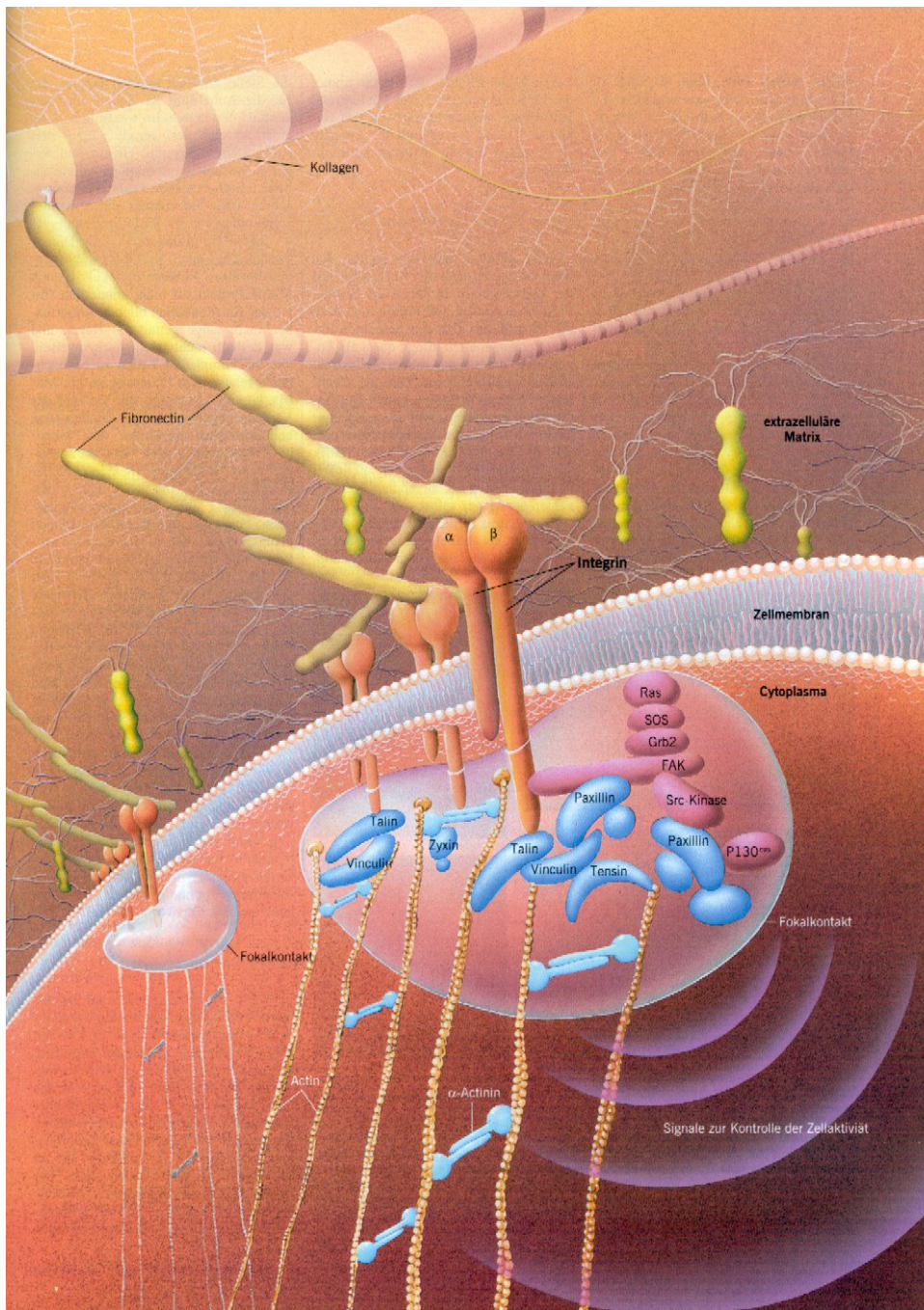
Diese grosse Rezeptordichte wird für eine schnelle Antwort auf eine Blutung vorausgesetzt. Personen, denen die GPIIb/IIIa-Funktion durch genetisch bedingte Fehlfunktion von GPIIb/IIIa fehlt (Glanzmanns Thrombasthenie), weisen verschiedene Blutungs-Fehlfunktionen auf¹¹. Die Erkennungssequenz all dieser Substanzen, die für die Wechselwirkung zum Rezeptor verantwortlich ist, scheint hauptsächlich ein Tripeptid, das RGD- (Arg-Gly-Asn-) Motiv, sowie eine längere Sequenz, KQAGCV (Lys-Gln-Ala-Gly-Cys-Val), auf dem Carboxyl Terminus der γ -Kette von Fibrinogen zu sein^{12, 13, 8}. Viele Peptide die die Sequenz RGD enthalten, blockieren die Fibrinogenbindung und verhindern so die Bildung von Thrombosen^{14, 15, 16, 17}. Normalerweise binden nicht aktivierte zirkulierende Blutplättchen nicht über GPIIb/IIIa an Liganden und aggregieren nicht, ohne stimuliert zu werden. Nach einer Aktivierung durch Agonisten (z.B. ADP, Thrombin, Kollagen, Thromboxan A₂) gehen die Blutplättchen eine schnelle Formänderung ein und bilden herausragende Pseudopodien, welche eine hohe Dichte an Adhäsionsrezeptor am GPIIb/IIIa enthalten. Diese wiederum gehen während der Aktivierung eine notwendige Konformationsänderung ein, die es ihnen möglich macht, an Liganden zu binden und die zur Plättchenaggregation führt¹⁸.

Weil die Aktivierung des Glycoproteins IIB/IIIa auf den Blutplättchen den letzten gemeinsamen Weg („final common step“) der Plättchenaggregation darstellt, unabhängig vom Agonisten der die Aggregation stimuliert, ist die Inhibition der Bindung von Fibrinogen zum GPIIb/IIIa-Komplex ein exzellentes Ziel um die Plättchenaggregation zu verhindern. Dies ist besonders nach pathophysiologischen Zuständen der erhöhten Gerinnungsneigung, z.B. Herzinfarkt, Hirnschlag und nach Operationen, erwünscht bzw. kann lebensrettend sein.

Durch spezifische Blockierung der Bindungsstellen für RGD am Rezeptor kann somit die Blutgerinnung gehemmt oder verhindert werden. Eine erste Entdeckung eines potenten (IC₅₀ = 130-200 nM) Antagonisten, war ein kleines 72 Aminosäuren enthaltendes, stark Disulfid-verbrücktes Protein, Trigramin, vom Gift der indischen grünen Baumvipere¹⁹. Daraufhin wurden einige andere peptidische Inhibitoren aus Viper- und Grubenottergiften identifiziert. All diese Antagonisten werden Disintegrine genannt²⁰. Disintegrine sind generell aber nicht spezifische Inhibitoren von RGD-abhängigen Integrinen wie GPIIb/IIIa, $\alpha_v\beta_3$ und dem Fibronectinrezeptor $\alpha_5\beta_1$ ^{21, 22}.

Man nimmt an, dass auch andere Domänen z.B. des Schlangengiftproteins Echistatin in einer Bindung zum GPIIb/IIIa beteiligt sind und zu einer Aktivierung des Integrins und einer Erweiterung der Ligandspezifität führen²³.

Alle diese Disintegrine haben zum Verständnis der Wechselwirkung von kleinen Liganden (z.B. Antagonisten) mit GPIIb/IIIa beigetragen, waren aber aus verschiedenen Gründen keine idealen Kandidaten für eine weitere Entwicklung. Jedoch hat die Entdeckung und Charakterisierung von Disintegrinen zum Design von kleinen zyklischen Peptiden und Peptidomimetika sowie kleinen organischen Molekülen mit besseren pharmazeutischen Eigenschaften geführt.

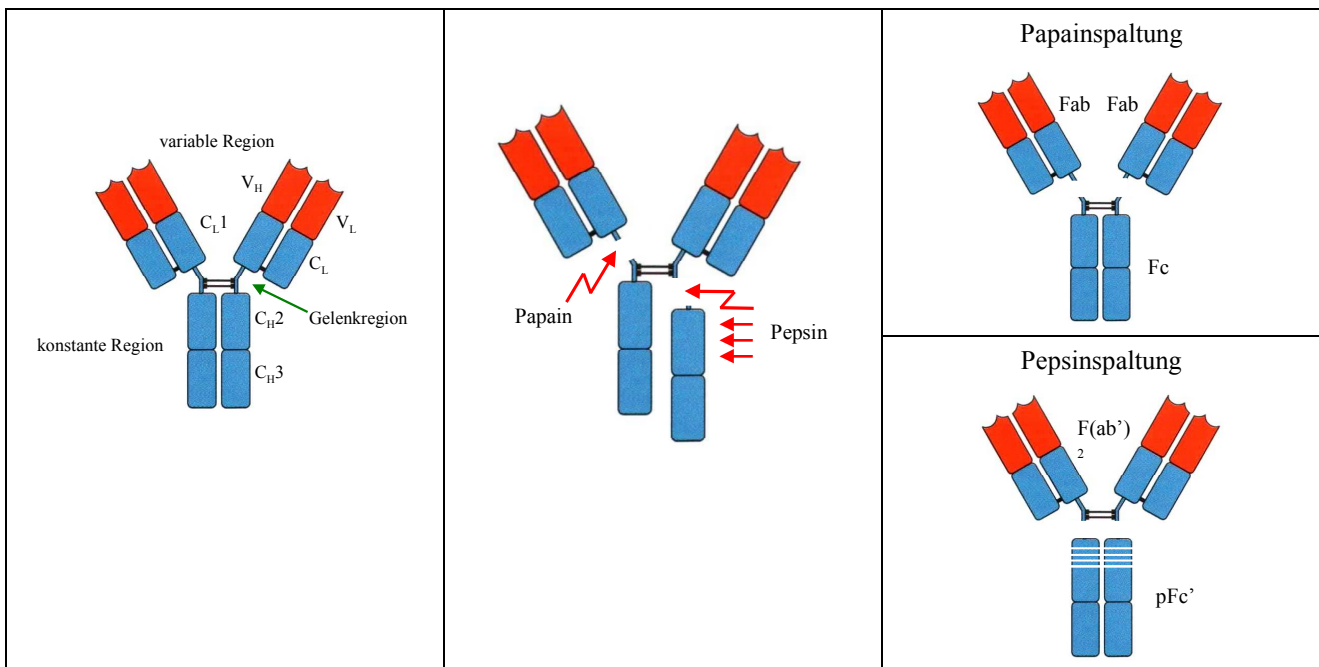


Figur 2. Schematische Darstellung der membrangebundenen α - und β -Rezeptoren und deren nachfolgender Rezeptorenkaskade ²⁴.

1.3 Monoklonale Antikörper ²⁵

Antikörper sind die antigenspezifischen Produkte von B-Zellen (B-Lymphocyten) und werden als Reaktion auf eine Infektion gebildet. Sie besitzen grundlegend zwei Funktionen. Einerseits die Bindung des Pathogens, welches die Infektion hervorgerufen hat, andererseits die Mobilisation von

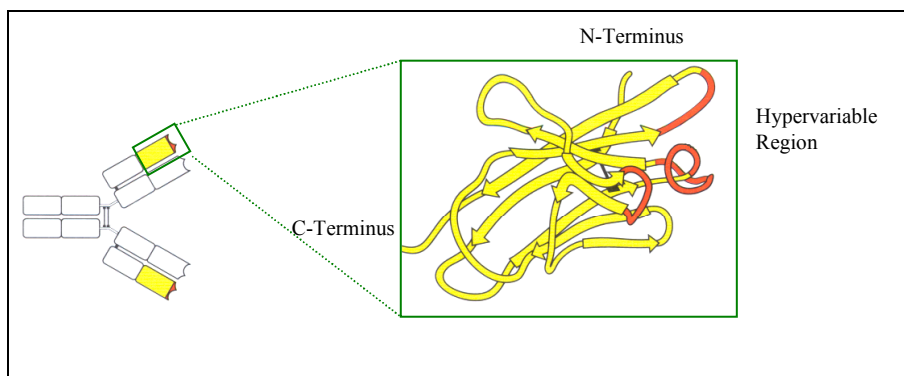
Zellen und Molekülen, um das Pathogen zu zerstören, wenn der Antikörper daran gebunden hat. Die antigenbindende Region ist die variable Region (V-Region), die konstante Region (C-Region) ist für die Effektormechanismen des Immunsystems zuständig. Antikörper gehören zu den Plasmaglobulinen und bilden als Klasse die Immunglobuline (Ig), welche biochemisch und funktionell fünf Klassen von Antikörpern bilden (IgM, IgD, IgG, IgA und IgE), wobei IgG den am häufigsten vorkommende Isotypen darstellt. IgG-Antikörper haben ein Molekulargewicht von ca. 150 kD und bestehen aus zwei jeweils identischen schweren (heavy, H) Ketten und zwei leichten (light, L) Ketten, die durch Disulfidbrücken in der Gelenkregion (hinge region) miteinander verbunden sind (**Figur 3**).



Figur 3. Der Aufbau eines Antikörpers aus leichten und schweren Ketten, die Angriffsstellen der proteolytischen Enzyme Pepsin und Papain sowie die Strukturen der Antikörperbruchteile nach der partiellen Spaltung.

Weiter kann man Antikörper unterteilen in Fab („Fragment antigen binding“) und Fc („Fragment crystallizable“) einteilen. Diese entstehen bei einer Verdauung mit der Protease Papain, wobei bei Pepsinverdauung ein F(ab)₂- und ein pFc'-Fragmente entstehen.

Die Antigenspezifität eines Antikörpers ist bedingt durch seine drei hypervariablen Regionen (HV1, HV2, HV3) der Aminosäuresequenzen in den variablen Regionen des Antikörpers, die zwischen den vier weniger variablen Gerüstregionen eingebettet sind (**Figur 4**). Die Gerüstregionen bilden β -Faltblätter, wobei die hypervariablen Regionen, die aus 10 – 15 Aminosäuren bestehen, den Schleifen am Rand entsprechen. Die Spezifität wird aber durch die Kombination der schweren und leichten Ketten bestimmt, da die gesamte Oberflächenstruktur die Antigenbindungsstelle oder komplementaritätsbestimmende Region bildet. Antigene können im Falle von kleinen Molekülen (Haptene, Peptide oder Kohlenhydrantigene) auf der Oberfläche, sowie zwischen den variablen Domänen in Taschen oder Gruben binden, grössere Antigene (Proteine) werden auf ausgedehnten Gebieten der Oberflächen gebunden und aufgrund ihrer Erkennungsregionen, den sogenannten antigenen Determinanten / Epitopen, erkannt.



Figur 4. Die hypervariable Region zwischen den β -Faltblättern der Gerüstregionen

Die Antigen-Antikörper Wechselwirkung an den komplementären Oberflächen sind die Summe aus nichtkovalenten elektrostatischen Kräften, Wasserstoffbrücken und vdW-Kräften, wobei hydrophobe Wechselwirkungen z.B. von Aromaten eher für die „Formgebung“ der Oberfläche dienen. Die hydrophobe WW ist proportional der dem Wasser abgewandten Oberfläche und kann bei einigen Antigenen den grössten Teil der Bindungsenergie ausmachen.

1.4 Kombinatorische Chemie

Das Konzept der kombinatorischen Chemie stammt – wie könnte es auch anders sein – aus der Natur, die durch die Kombination von nur 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren eine nahezu unendliche Anzahl von Peptiden und Proteinen aufzubauen vermag.

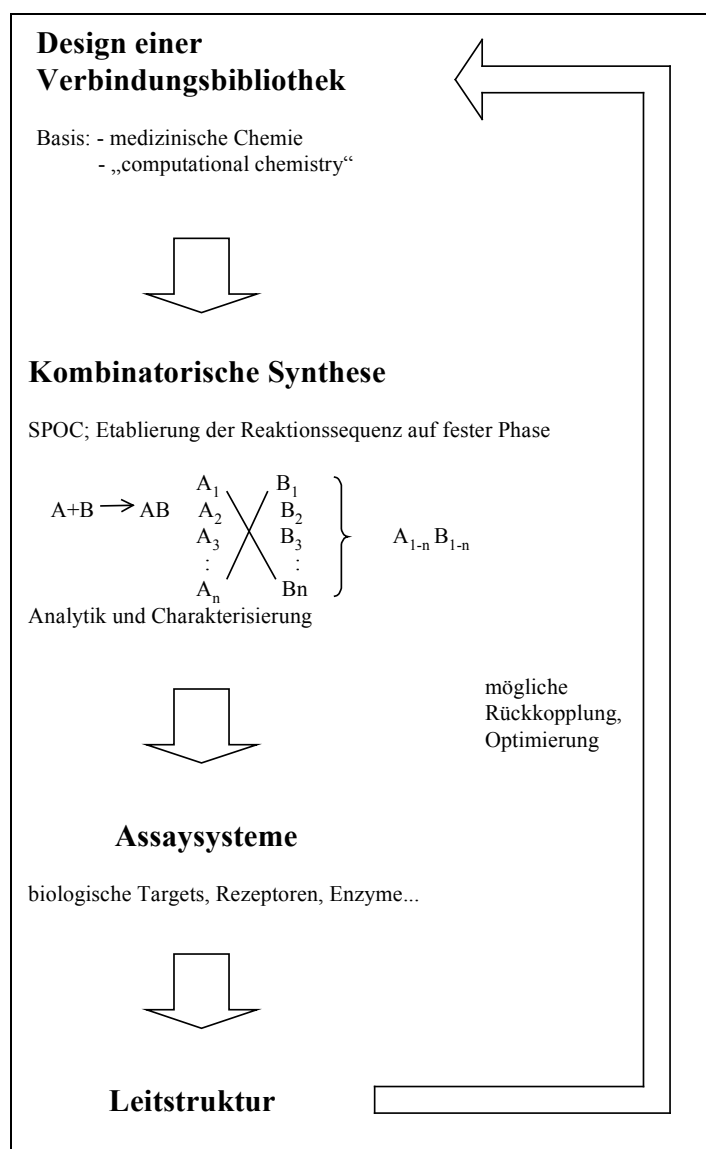
Im Gegensatz zu der klassischen Chemie, bei der jede Synthese auf ein einzelnes Produkt abzielt, werden in der kombinatorischen Chemie allgemein anwendbare Reaktionen/Methoden entwickelt und optimiert, die einerseits einfach und effizient, andererseits aber auch kompatibel zu verschiedenen „Building Blocks“ sind und die es erlauben, die einzelnen Produkte einer Bibliothek in gleicher Menge und Reinheit herzustellen. Alle diese aufgeführten Kriterien führen dazu, dass die in der kombinatorischen Chemie angewendeten Methoden sich auf wenige relativ einfache und gut untersuchte Reaktionen beschränken.

Wie in anderen industriell-technischen Gebieten haben sich computergesteuerte Roboter und voll mechanisierte Apparate seit einiger Zeit auch in der synthetischen organischen Chemie durchgesetzt. Nicht nur zur Analyse, wie dies schon länger der Fall war (MS, NMR, HPLC und gekoppelte Systeme mit Autosampler), sondern auch als Syntheseapparate, die einzelne Schritte oder ganze Abläufe einer chemischen Synthese durchführen. Diese Computerisierung und Technisierung bildete die Grundlage für die sogenannte kombinatorische Chemie: Sie ermöglicht, anders als die herkömmliche Chemie, bei der manuell eine Substanz nach der anderen synthetisiert wird, immer mehrere Reaktionen parallel durchzuführen und durch den Einsatz von verschiedenen Edukten mit den gleichen funktionellen Gruppen eine ganze Vielfalt von Verbindungen mit demselben Grundgerüst (Verbindungsbibliothek „Library“) herzustellen. Auch können ganze Reaktionssequenzen ohne manuellen Eingriff von der Einwaage oder dem Abpipettieren der

Edukte, Reagenzien und Lösungsmittel über die Reaktion unter den gewünschten Bedingungen (Temperatur, Schutzgas, Druck) bis hin zur Aufarbeitung und Isolierung (Filtration, Extraktion, Waschschrte, Chromatographie) durchgeführt werden. Die neueste Generation der Roboter ist sogar direkt mit der jeweils gewünschten Apparatur zur Analyse der Substanzen gekoppelt, sei dies HPLC, GC, MS, NMR oder UV/IR oder gar gekoppelte Systeme.

1.4.1 Kombinatorische Chemie und Wirkstoffsuche

Neben Bibliotheken von Peptiden können natürlich auch Peptoide (N-substituierte AS), andere Peptidmimetika und kleine organische Moleküle in einer Bibliothek hergestellt werden. Wird in einem Screening eine Leitstruktur identifiziert, kann der Prozess iterativ in den „Drug Finding Process“ integriert werden (**Figur 5**).

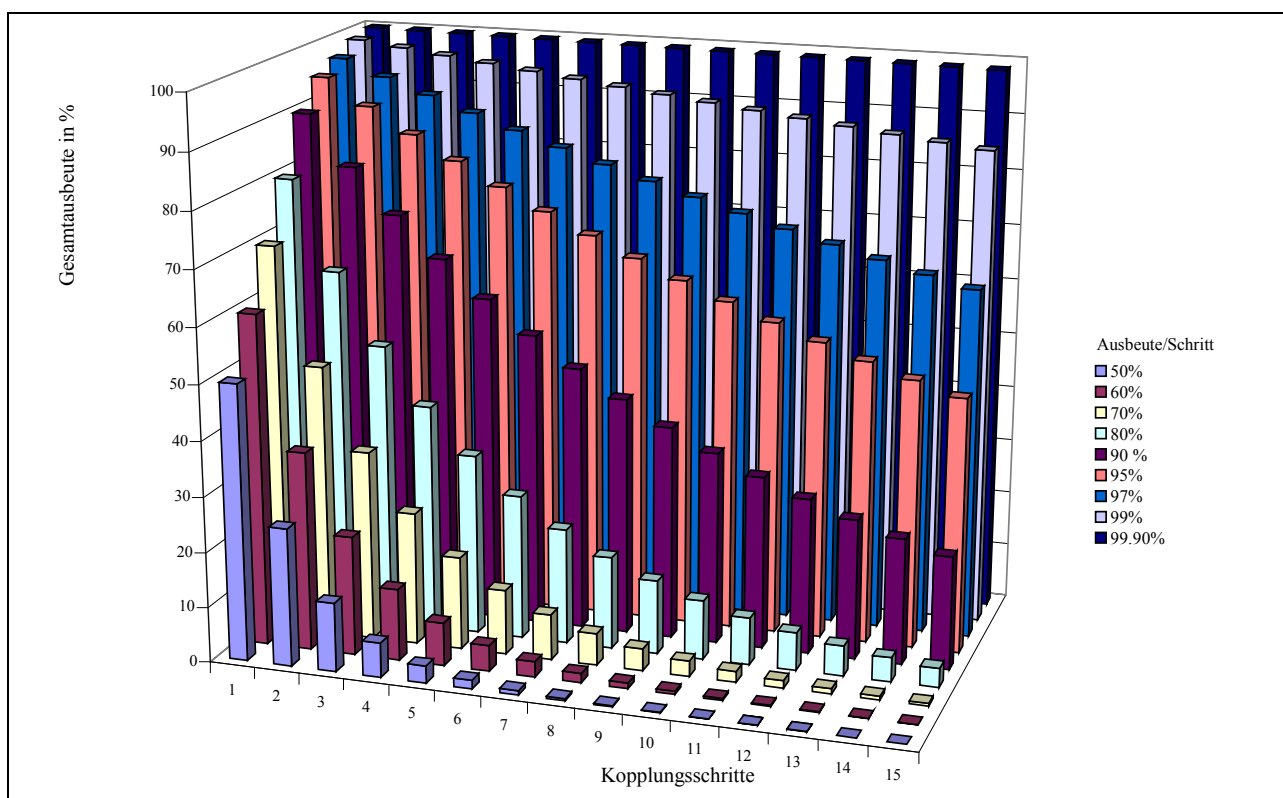


1.4.2 Methoden in der Kombinatorischen Chemie

Die Synthesemethoden in der kombinatorischen Chemie kann man grob in zwei Sparten unterteilen, die Festphasensynthese und die Synthese in Lösung, wobei jede Methode ihre Vor- und Nachteile bietet. Das Konzept der Festphasenchemie wurde 1963 von Merrifield zur Vereinfachung der Peptidsynthese eingeführt²⁶ und bietet einige Vor- und Nachteile (**Tabelle 1**):

| Vorteile | Nachteile |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> Vereinfachte Reaktionsführung, Reinigungs- und Isolierungsschritte entfallen. Überschüssige Reagenzien werden einfach gewaschen. | <ul style="list-style-type: none"> Das Harz und das benutzte Linkersystem müssen mit den verwendeten Reaktionsbedingungen kompatibel sein. |
| <ul style="list-style-type: none"> Durch hohe Überschüsse an Edukten können auch für thermodynamisch benachteiligte Reaktionsprodukte bessere Umsetzungsgrade erzwungen werden. | <ul style="list-style-type: none"> Die Analytik am Harz ist durch das polymere Trägermaterial und die teilweise niedrige Beladung sehr erschwert. |
| <ul style="list-style-type: none"> Einfache Automatisierung möglich. | <ul style="list-style-type: none"> Durch eine nie vollständige Reaktion entstehen bei jeder Reaktion Fehlsequenzen oder harzgebundene Nebenprodukte, die durch Waschschritte nicht eliminiert werden und in einem nächsten Schritt weiterreagieren können (Figur 6)²⁷. |
| <ul style="list-style-type: none"> Keine intermolekularen Reaktionen, da auf dem Harz (meist geringe Beladung, < 0.5 mMol/g) das „Verdünnungsprinzip“ herrscht. | <ul style="list-style-type: none"> Die Anzahl verfügbarer und optimierter Reaktionen ist noch sehr beschränkt. |
| | <ul style="list-style-type: none"> Keine heterogen katalysierte Reaktionen durchführbar. |
| <ul style="list-style-type: none"> Die Kinetik von Reaktionen am Harz unterscheidet sich teilweise beträchtlich von Reaktionen in Lösung. | |

Tabelle 1. Vor- und Nachteile der Festphasensynthese



Figur 6. Entwicklung der Gesamtausbeuten auf der Festphase nach n Reaktionsschritten mit jeweils einer bestimmten gleichbleibenden Ausbeute pro Reaktionsschritt.

Der Nachteil der fehlenden Aufreinigung der trägergebundenen Zwischenprodukte schränkt die Komplexität und die Länge der Reaktionssequenzen erheblich ein, wenn nicht Synthesen zur Anwendung kommen, die eine extrem hohe Ausbeute auf jeder Stufe liefern (z. B. Peptidsynthese).

Demgegenüber liegen die Vorteile der Synthese in Lösung auf der Hand:

- Kein erneuter Entwicklungsaufwand für die Übertragung der gewünschten Reaktionen auf Festphase notwendig.
- Keine Kopplung und Spaltung („cleavage“) vom Harz nötig.
- Einfacheres „Scale-Up“ möglich.
- Keine Entwicklung von evtl. komplizierten Linkerstrategien notwendig.

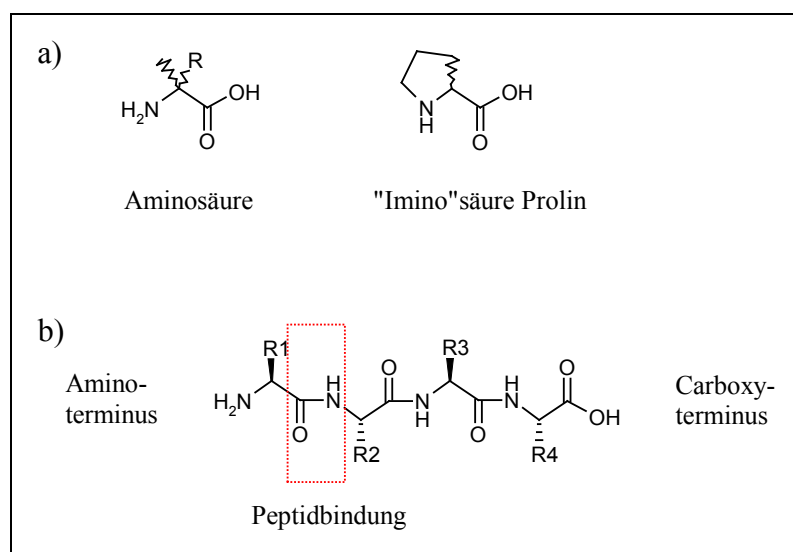
Die Nachteile der Synthese in Lösung sind bei kombinatorischer Arbeitsweise auch leicht ersichtlich:

- Eine Automatisierung, z.B. der Isolierung und Reinigung der Produkte ist wesentlich komplizierter, deshalb werden vor allem ein- bis zweistufige Synthesen auf diese Weise durchgeführt.
- Eine Aufarbeitung/Reinigung der Zwischenstufen ist sehr arbeits-/zeitintensiv.

Das Problem der kurzen Reaktionssequenzen in Lösung, die zu einer kleinen Produktdiversität führen, kann unter Verwendung der mittlerweile sehr vielfältigen Multikomponentenreaktionen (MCR, „multi component reactions“), die Bibliotheken mit hoher Diversität und sehr guten Ausbeuten liefern, umgangen werden. Ein klassisches Beispiel für eine in der kombinatorischen Synthese weit verbreitete Reaktion ist die Ugi-Reaktion ²⁸.

1.4.3 Peptidchemie an der festen Phase

Peptide (und Proteine) sind natürliche Polymere, die aus Aminosäuren aufgebaut und über Amidbindungen (Peptidbindung) aneinander gekoppelt sind (**Figur 7**). Sie sind ubiquitäre Bausteine in allen Organismen und wirken als Enzyme und Transport- und Speichersysteme (Hämoglobin, Ferritin). Des weiteren sind sie wichtigster Bestandteil von Muskelgewebe, sie übertragen und erzeugen Nervenimpulse, sind wesentlich an der Immunabwehr beteiligt (Antikörper) und steuern das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung (Hormone, Wachstumsfaktoren).

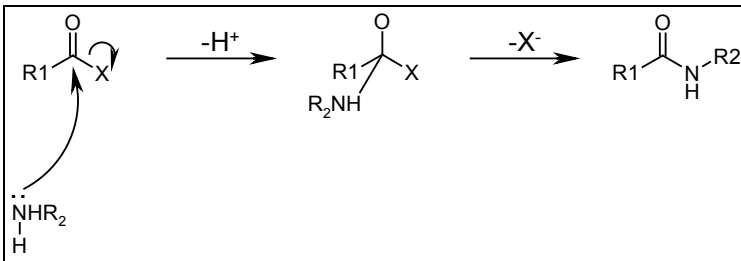


Figur 7. a) Bausteine von Peptiden und Proteinen, b) kurzes Peptid mit Hauptkette (enthält Peptidbindungen) und Seitenketten (R1 – R4)

1.4.3.1 Aktivierungs- und Kopplungsmethoden

Die Bildung einer Peptidkopplung zwischen einer Aminogruppe einer Aminosäure und einer Carboxygruppe einer anderen Aminosäure verlangt eine Aktivierung der Carboxygruppe,

normalerweise geschieht dies durch das Funktionalisieren mit einer e^- -ziehenden Abgangsgruppe. Danach greift das Amin nucleophil an den Carbonylkohlenstoff an. Der Mechanismus der Peptidbindung ist eine Mehrschrittreaktion, die über einen tetraedrischen Übergangszustand zum Produkt führt (**Schema 1**).

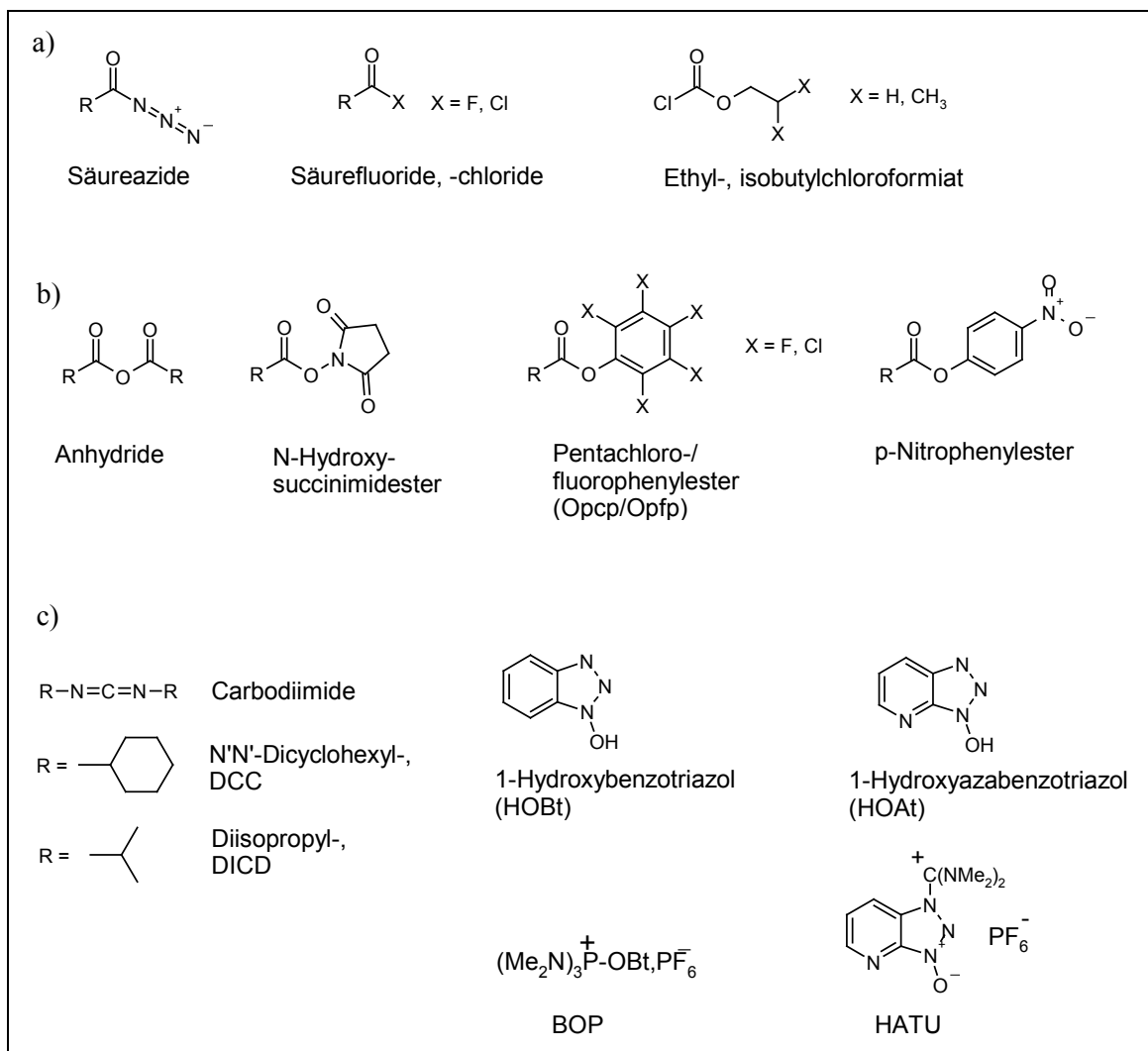


Schema 1. Vereinfachter Mechanismus der Bildung einer Peptidbindung; R_1 und R_2 sind Substituenten, X ist eine Aktivierungs-/Abgangsgruppe.

Generell existieren drei verschiedene Strategien um Peptidkopplungen durchzuführen:

- Das reaktive Acylierungsreagens wird zuerst separat in situ hergestellt, gefolgt von der Zugabe und Kopplung der Aminokomponente (Säurechloride, -fluoride, Säureazide, gemischte Anhydride mit Ethyl-/Isobutylchloroformiat).
- Isolierbare, teilweise kommerziell erhältliche Acylierungsreagenzien werden eingesetzt (Säureanhydride, Aktivester).
- Das Acylierungsintermediat wird in Gegenwart der Aminokomponente, durch Zugabe eines Aktivierungsreagens zu einer Mischung der beiden Komponenten, hergestellt (Carbodiimide, Phosponium-, Uroniumreagenzien).

Die gebräuchlichsten Reagenzien zur Peptidsynthese sind in **Figur 8** dargestellt.

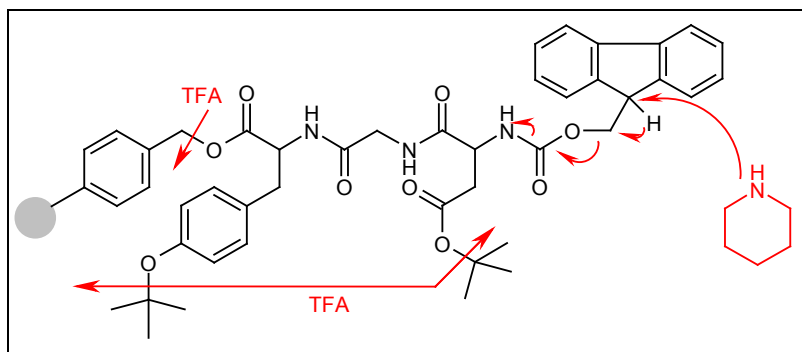


Figur 8. Die gebräuchlichsten Aktivierungs- und Kopplungsreagenzien in der Peptidchemie a) Säureazide ^{29, 30}; Säurehalogenide ⁸ b) Anhydride ^{7, 31}; Aktivester ^{32, 33, 34}; N-Hydroxysuccinimidester ³⁵; c) Carbodiimide ^{36, 37, 38}; HATU ³⁹; BOP ⁴⁰; HOBT ⁴¹

Detaillierte Ausführungen über die Vor- und Nachteile der einzelnen Aktivierungs- und Kopplungsmethoden können in „Principles of Peptide Synthesis“ ⁴² nachgelesen werden.

1.4.3.2 Schutzgruppenstrategien

Für die Peptidsynthese auf Festphase existieren zwei grundsätzlich verschiedene Strategien. Einerseits die Boc-/Bzl-Strategie, bei der die unterschiedliche Säureempfindlichkeit dieser beiden Schutzgruppen genutzt wird ⁴³, andererseits die häufiger verwendete Fmoc/tBu- Strategie, bei der die Seitenkettenschutzgruppen unter den Fmoc-Spaltbedingungen vollständig stabil sind (**Schema 2**).



Schema 2. Generelle Schutzgruppen- und Spaltstrategie bei der Fmoc-Chemie

Bei beiden Strategien werden die Peptide von C \rightarrow N aufgebaut. In **Tabelle 2** sind die wesentlichen Merkmale der beiden Strategien dargestellt.

| | Boc/Bzl-Strategie | Fmoc/tBu-Strategie |
|--|-------------------------------------|---|
| Entschützen der α -Amino-schutzgruppe | TFA/CH ₂ Cl ₂ | 20% Piperidin |
| Abspalten des Peptids vom Träger | HF oder TFMSA | Je nach Linker z.B. TFA/CH ₂ Cl ₂ 1:1 oder 1% TFA |
| Apparatur | Teflon beschichtete Apparatur | normale Glasapparatur |

Tabelle 2. Vergleich der beiden Methoden zur Peptidsynthese an Festphase ⁴¹

Die Schutzgruppen für die Festphasensynthese werden so gewählt, dass die terminalen α -Schutzgruppen zur Kettenverlängerung selektiv abgespaltet werden können, ohne die Seitenketten zu entschützen oder den Linker zu tangieren. Neben einer Vielzahl von möglichen Schutzgruppen gehören vor allem die tert-Butyloxycarbonyl- (Boc-) und die Benzyloxycarbonyl – (Z-) ^{44, 45} zu den klassischen Schutzgruppen der Peptidchemie, während die Fluorenylmethoxycarbonyl – (Fmoc-) Schutzgruppe ⁴⁶ erst im Laufe der letzten Jahre vermehrt Einzug in die Peptidsynthese gehalten hat (**Tabelle 3**) ⁴².


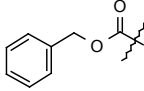
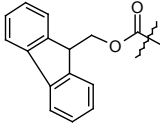
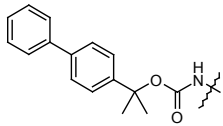
| Name und Abkürzung | Struktur | Entschützen mit | Lit. |
|--|---|---|------|
| tert-Butyloxycarbonyl- (Boc-) |  | TFA | 44 |
| Benzyloxycarbonyl- (Z-, Cbz-) |  | H ₂ /Pd-C, HF, HBr/CH ₃ COOH | 45 |
| 9-Fluorenylmethoxycarbonyl- (Fmoc-) |  | Piperidin, Dimethylamin | 46 |
| 2-(4-Biphenyl)- isopropoxycarbonyl- (Pboc-) |  | TFA, H ₂ /Pd-C | 47 |

Tabelle 3. Die am häufigsten verwendeten α -Aminoschutzgruppen in der Festphasen-Peptidchemie

Für die verschiedenen Seitenketten der Aminosäuren mit ihren funktionellen Gruppen gibt es auch eine Vielzahl von Schutzgruppen. Die gebräuchlichsten sind die *tert*-Butylgruppe⁴⁸ die Benzylgruppe⁴⁹, die Allylgruppe⁵⁰, die Tritylgruppe⁵¹ und die Pmc-Schutzgruppe⁵². In **Tabelle 4** sind die typischerweise verwendeten Kombinationen von Aminosäuren und Schutzgruppen für deren Seitenketten dargestellt.

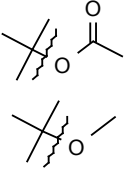


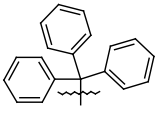
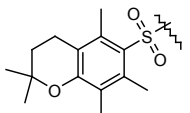
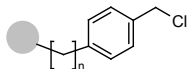
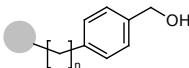
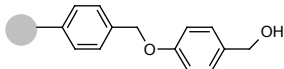
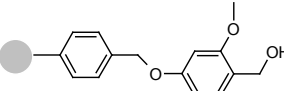
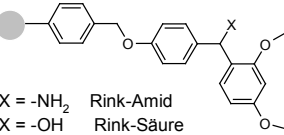
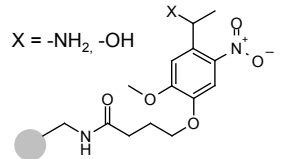
| Name und Abkürzung | Struktur | Entschützen mit | Geeignet für | Lit. |
|--|---|---|----------------------------|------|
| <i>tert</i> -Butyl- (tBu-) |  | TFA | Ser, Thr, Tyr, Glu, Asp | 48 |
| Benzyl- (Bzl-) |  | H ₂ /Pd-C, HF, HBr/CH ₃ COOH | Ser, Thr, Tyr, Glu, Asp | 49 |
| Allyl- (All-) |  | Nucleophile/Pd ⁰ | Ser, Thr, Tyr, Glu, Asp | 50 |
| Triphenylmethyl- (Trt-) |  | TFA | His, Asn, Gln | 51 |
| 2,2,5,7,8-Pentamethyl- chroman-6-sulfonyl- (Pmc-) |  | TFA | Arg | 52 |

Tabelle 4. Die am häufigsten verwendeten Seitenkettenschutzgruppen in der Festphasen Peptidchemie^{41, 32}

1.4.3.3 Linkerstrategien

Eine für die Qualität der Endprodukte und für die Syntheseplanung wichtige Entscheidung ist die Wahl des richtigen Linkers. Dies ist abhängig davon, welche Art Chemie angewendet wird, welche Reaktionsbedingungen herrschen, welche Substanzmengen synthetisiert werden sollen und natürlich wie teuer ein jeweiliges Harz mit Linker ist. Die Palette an verfügbaren oder bekannten Linkern ist enorm gross und hat dank dem Boom der kombinatorischen Chemie in den letzten Jahren stark zugenommen. Ein Problem der Linker-Chemie liegt darin, dass in der organischen Synthese nicht jedes zu synthetisierende Molekül eine einfache Ankergruppe wie eine Carboxy- oder Aminogruppe besitzt, sondern viele andere funktionelle Gruppen existieren, die nicht als Ankergruppen dienen können. In der Literatur wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von Beispielen über spezifische Linkerstrategien für etliche Substanzklassen publiziert. In **Tabelle 5** sind einige der in der Peptidchemie am häufigsten verwendeten Linker mit ihren Eigenschaften wie Kopplungsgruppe, Abgangsgruppe und Spaltbedingungen aufgeführt.

| Name | Struktur | Gekoppelte Gruppe | Abgangsgruppe | Spaltbedingungen |
|--|---|--|--|---|
| Merrifield-/Halomethyl-Harz |  | -RCOOH -ROH -RCOOH -RCOOH | -RCOOH -ROH -RCH ₂ OH -RCO ₂ CH ₃ | TFMSA; HF; H ₂ /Pd “ LiBH ₄ ; DIBAL MeONa; Ti(Oet) ₄ , EtCOOCH ₃ |
| Hydroxymethyl-Harz |  | -RCOOH -ROH -RCOOH -RCOOH | -RCOOH -ROH -RCONR ₁ R ₂ -RCH ₂ OH | TFA TFA R ¹ R ² NH, AlCl ₃ , CH ₂ Cl ₂ DIBAL |
| Wang-Harz |  | | | |
| SASRIN TM (Super Acid-Sensitive Resin) |  | -RCOOH (voll geschützt) | -RCOOH | 1 % TFA/CH ₂ Cl ₂ |
| Rink-Amid Rink-Säure |  X = -NH ₂ Rink-Amid X = -OH Rink-Säure | <u>X = OH</u> -RCOOH -ROH <u>X = NH₂</u> -RCOOH | -RCOOH -ROH -RCONH ₂ | 10 % AcOH 5 % TFA TFA |
| Hydroxymethyl-Photolinker AM |  X = -NH ₂ , -OH | <u>X = OH</u> -RCOOH -ROH <u>X = NH₂</u> -RCOOH | -RCOOH -ROH -RCONH ₂ | hv hv |

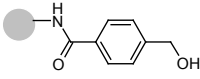
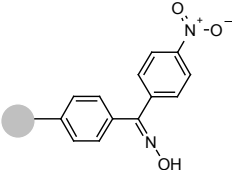
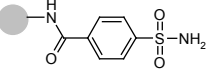
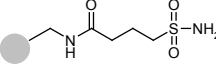
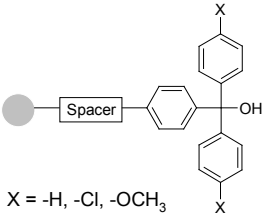
| | | | | |
|------------------------|--|--|--|--|
| HMBA-Harz |  | -RCOOH -RCOOH -RCOOH -RCOOH -RCOOH -RCOOH | -RCOOH RCONH ₂ -RCONHR ₁ -RCH ₂ OH -RCO ₂ CH ₃ -RCONHNH ₂ | NaOH aq. NH ₃ R ₁ NH ₂ NaBH ₄ /EtOH MeOH/TEA NH ₂ NH ₂ /DMF |
| Oxime |  | | -R ₂ NCO -R ¹ NHCONHR ₂ | R ₁ NH ₂ |
| Safety-Catch-Harz | | | | |
| 4-Sulfamyl-benzol-AM |  | -RCOOH | -RCONHR ₁ | a) CH ₂ N ₂ b) R ₁ NH ₂ |
| 4-Sulfamyl-buytyryl-AM |  | -RCOOH | -RCONHR ₁ | <u>für beide:</u> a) Br-CH ₂ CN b) R ₁ NH ₂ |
| Trityl Harze |  X = -H, -Cl, -OCH ₃ | -RNH ₂ -ROH -RCONHNH ₂ -RCOOH -RSH | -RNH ₂ -ROH -RCONHNH ₂ -RCOOH -RSH | < 20 % TFA < 5 % TFA < 20 % TFA < 5 % TFA für X = -Cl: > 50 % TFA für X = -OCH₃ > 3 % TFA |

Tabelle 5. Die gebräuchlichsten Linker in der Peptidchemie. Aufgeführt sind die Strukturen (wobei die Spacergruppen zum Harz bei den einzelnen Linkern leicht variieren können), die Kopplungsgruppen sowie die Spaltprodukte und die Abspaltbedingungen.

1.4.4 Prinzipielle Strategien in der kombinatorischen Chemie

1.4.4.1 Die Parallel-Synthese

Die einfachste und am meisten angewendete kombinatorische Methode zur Herstellung von Verbindungen ist die Parallelsynthese. Dabei werden in mehreren Reaktionsgefässen gleichzeitig dieselben Reaktionen durchgeführt. In jedem Reaktionsgefäss werden aber andere Bausteine „Building Blocks“, also Verbindungen mit gleichen funktionellen Gruppen aber leicht verschiedenen Strukturen/Grundgerüst („backbone“) eingesetzt. Die Parallelsynthese wird eingesetzt um eine grosse Anzahl Einzelverbindungen (< 1000) mit gleichem Grundgerüst in Milligramm-Mengen herzustellen, welche dann für mehrere biologische Tests („Screening“) verwendet werden können. Der apparative- und Arbeitsaufwand dieser Synthesemethode ist, verglichen mit allen anderen Methoden der grösste, da schon für die Synthese eine geeignete Syntheseapparatur, manuell betrieben, teil- oder vollautomatisiert, vorhanden sein muss. Auch die Reinigung ist aufwendig, da zur Isolierung von Dutzenden Verbindungen nur eine präparative HPLC-Station gekoppelt mit einem Massenspektrometer sinnvoll ist. Um auch mittels Parallel-

Methodik grosse Mengen an Verbindungen zu synthetisieren sind verschiedene Techniken entwickelt worden, beispielsweise:

- Die Pin-Synthese

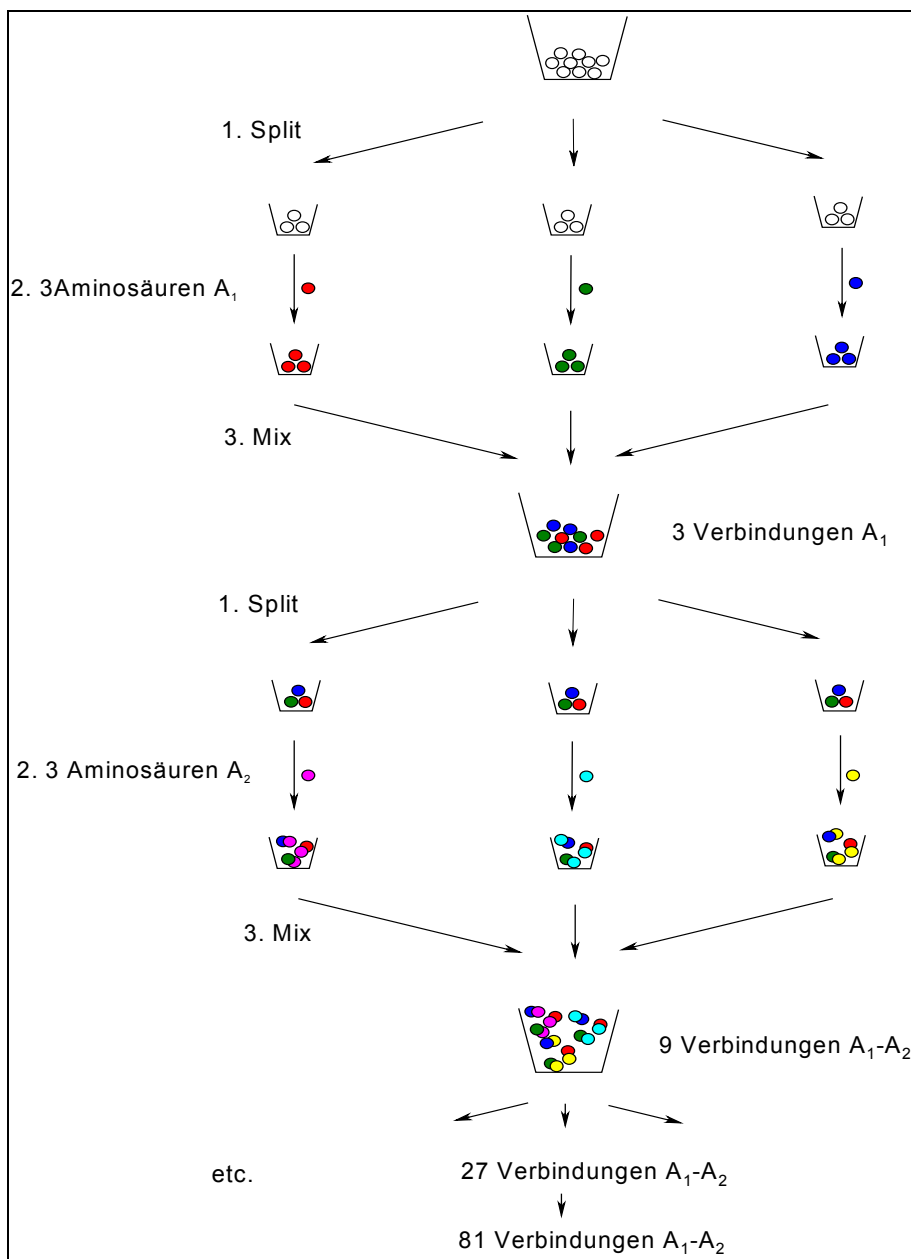
Zur multiplen, parallelen Synthese von Peptiden wurde von Geysen et al.⁵³ eine Methode entwickelt, bei der Polyethylenstäbchen (sog. „Pins“) mit einer polyacrylsäuremodifizierten Oberfläche zur Anwendung kommen. Diese sind in Arrays im ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay)-Format angeordnet und ermöglichen somit die Synthese von Einzelverbindungen. Mit der Entwicklung neuer „Pins“ mit höherer Beladung ist der Einsatz dieser Strategie auch in der kombinatorischen Chemie möglich.

- Die SPOT-Synthese

Die SPOT-Synthese auf Zellulose⁵⁴ ist eine effiziente Methode für die schnelle und flexible Darstellung einer grossen Anzahl Peptide oder organischer⁵⁵ Verbindungen und anschliessendem Screening^{56, 57}.

1.4.4.2 Die „Split and Mix“-Methode – One Bead-One Structure – Selectide Process

Mit der „Split and Mix“-Methode können in sehr kurzer Zeit sehr grosse Bibliotheken hergestellt werden. Erstmals beschrieben wurde das Prinzip von Furka et al. zur Herstellung von Peptidbibliotheken⁵⁸. Das Trägermaterial (z. B. Harzkügelchen, „Solid Phase Beads“) wird in Aliquote aufgeteilt und mit einem Baustein umgesetzt. Nach der Reaktion werden alle Aliquote wieder vereinigt und vermischt, sodass bei der nächsten Aufteilung des Trägermaterials die trägergebundenen Reaktanden in den Aliquoten statistisch verteilt sind. Durch diese Methode erhält man Bibliotheken, die alle Komponenten äquimolar enthalten und deren kleinste nichtteilbare Einheiten, die Harzpartikel, je nur eine einzige Verbindung enthalten („one bead-one compound“) (**Figur 9**).



Figur 9. Prinzip einer Split & Mix – Synthese einer Peptidbibliothek bestehend aus 20 Aminosäurebausteinen

Die Anzahl synthetisierter Verbindungen ergibt sich aus der Anzahl Reaktionsschritten und der Anzahl eingesetzter „Building Blocks“ bei jedem Schritt:

$$N = n_1 \cdot n_2 \cdot n_3 \cdot \dots \cdot n_m$$

N = Anzahl Verbindungen
n = Anzahl „Building Blocks“
1 bis m = Reaktionsschritte

Gleichung 1

Für Reaktionen, bei denen die Anzahl „Building Blocks“ bei jedem Schritt gleich ist:

$$N = n^m$$

Gleichung 2

Trotz der Einfachheit der Methode gibt es Einschränkungen. Die Zahl der Beads sollte mindestens vier mal grösser sein als die Anzahl Verbindungen, um sicher zu sein, dass mindestens 99 % der gewünschten Verbindungen mindestens ein mal in der Bibliothek vorkommen. Für Bibliotheken mit $>10^6$ Verbindungen wird somit die zu verwendende Harzmenge unpraktikabel.

1.4.4.3 Selektionsprozesse für Split und Mix-Bibliotheken

Nach erfolgreicher Synthese kann die gesamte Bibliothek gegen ein Akzeptormolekül (z. B. natürlicher oder künstlicher Rezeptor, Enzyme, Antikörper oder sogar kleine Moleküle) getestet (gescreent) werden, wie es z.B. Lam et al. mit Peptidbibliotheken getan haben ^{59, 60, 61}. Dieser Ansatz wurde insofern weiterentwickelt, als dass fluoreszenzbasierte Assays mit fluoreszenzaktivierten Zellsortierern ⁶², Fluoreszenzmikroskopie ⁶³, radioaktives Binden von Liganden ^{64, 62} oder magnetisches Binden von Liganden ⁶⁵ zur Anwendung kamen. Ein solcher „Bead“-Bindungsassay zeichnet sich durch folgende Merkmale aus:

- Das Screening ist extrem schnell, die Dauer für das Screening von 10^7 - 10^8 Beads beträgt nur ein paar Stunden.
- Die Intensität der Fluoreszenz auf dem Bead ist normalerweise proportional zur Bindungsaffinität des Liganden ⁶².
- Die Bibliothek kann mehrere Male gegen verschiedene Akzeptoren gescreent werden.
- Der apparative Aufwand hält sich in Grenzen.

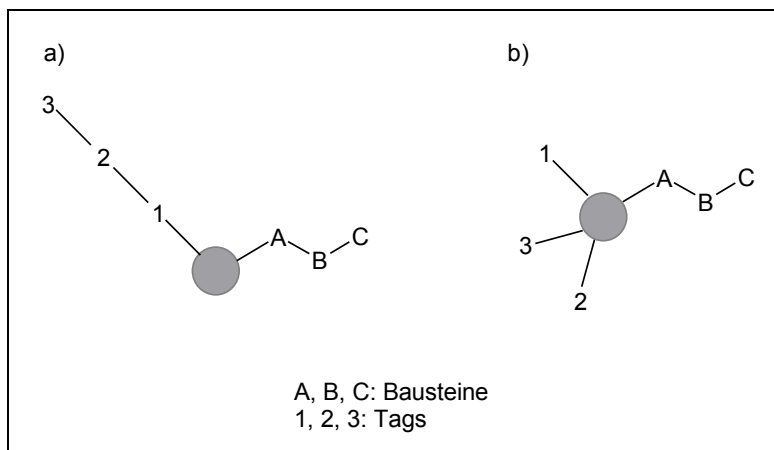
Bei einem „Screening“ ist es nicht ungewöhnlich, zu viele positive Beads (> 1000) zu erhalten. Um die am Akzeptor am besten bindenden Beads herauszufiltern, ist es teilweise möglich und notwendig, die Bibliothek unter restriktiveren Bedingungen zu screenen. Es gibt einige Methoden um die Stringenz der Bedingungen zu erhöhen ^{66, 67}:

- Durch Verlängern der Waschzeit, um nur die Verbindungen mit einer langsamen Dissoziationsrate k_D („off-rate“) zu identifizieren.
- Die freie Konzentration des Akzeptors kann durch Zugabe einer bescheidenen Konzentration von kompetitivem Ligand oder Substrat gesenkt werden.
- Die Bedingungen können durch Zugabe von chaotropen Reagenzien oder Veränderung der Ionenstärke und des pH-Wertes so verändert werden, dass die Affinitäten von allen Liganden erniedrigt werden. Das Risiko dabei ist, dass Verbindungen identifiziert werden, die unter physiologischen Bedingungen nicht oder nur schwach binden.

- Einsatz einer niedrigeren Konzentration an Akzeptor (bsp. Rezeptor, mAB, u.a.), wobei der Verbrauch an Akzeptor vermieden werden und auf eine genügende Inkubationszeit geachtet werden muss, damit alle Beads ein Gleichgewicht erreichen.

1.4.5 Analyse von trägergebundenen Substanzen

Die identifizierten „positiven“ Beads werden nach einem biologischen Screening isoliert und die Substanz analysiert. Hier stellt sich das Problem der Substanzmenge, die im Falle von Standardbeads im unteren pMol-Bereich liegt. Im Falle von Peptiden geschieht die Analyse bevorzugt mit Edman-Sequenzierung, im Falle von Peptiden und kleinen organischen Molekülen kann auch die Massenspektrometrie dienlich sein oder sie werden indirekt durch eine sequenzierbare Komponente („Code“) auf dem „Bead“, die allen nicht-sequenzierbaren Komponenten zugeordnet ist, identifiziert. Bei diesem „Tagging“ wird auf einem zweiten, orthogonalen Weg auf dem Bead ein „tag“ angebracht, der die Identität des Moleküls codiert. Die Codierung kann auf zwei Weisen geschehen. Einerseits der Aufbau einer Sequenz parallel zur Bibliothekssynthese, in der die Sequenzposition des „tags“ den Syntheseschritt und die Struktur des „tags“ den Baustein („Building Block“) repräsentiert. Andererseits werden zu jedem Syntheseschritt „tags“ direkt ans Harz gekoppelt, wobei dieser „tag“ den Reaktionsschritt sowie die Struktur des eingesetzten Bausteins angibt (**Figur 10**).



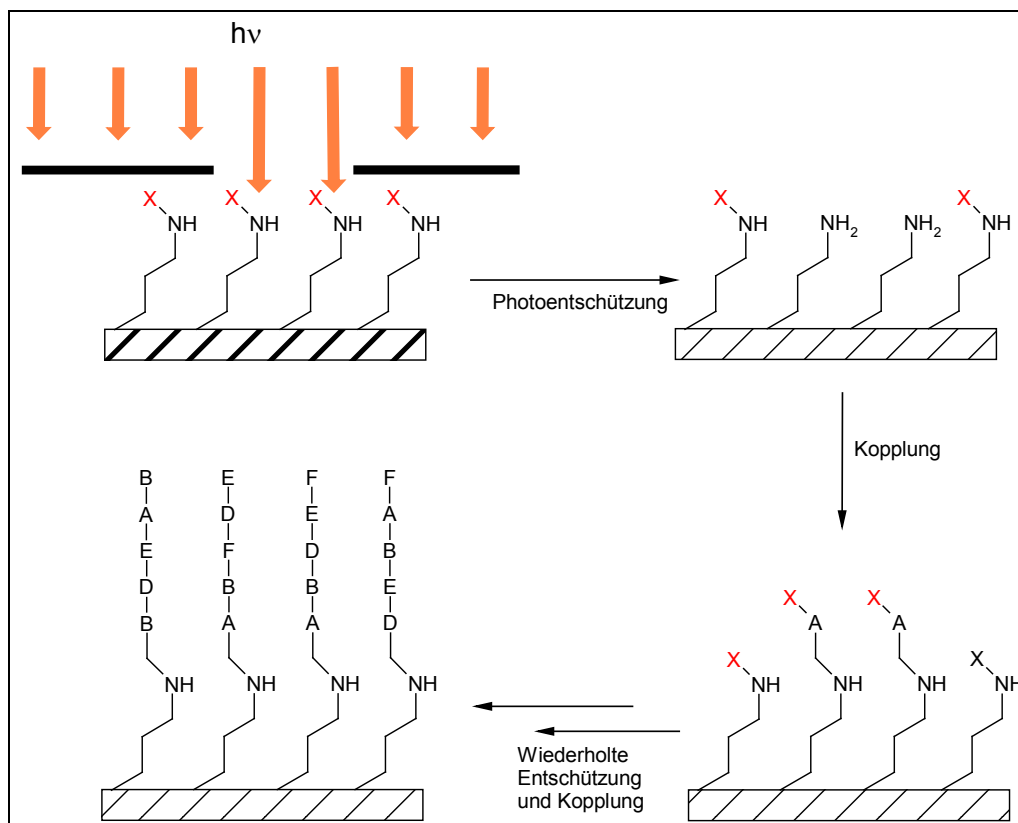
Figur 10. a) Orthogonales „Tagging“, b) Individuelles Tagging auf dem Bead für jeden Baustein

Eine raffinierte Methode ist die Nutzung von zwei verschiedenen Linkern, an denen man die gewünschte Synthese durchführt. Die Substanzen lassen sich unter verschiedenen Bedingungen von ihnen abspalten, z.B. unter verschiedenen pH-Werten, photolytisch bei verschiedenen Wellenlängen u.s.w., wobei die verwendeten Reaktionsbedingungen für beide Linker kompatibel sein müssen. Die einfachsten „tags“ wären Peptide ^{68, 69} und Oligonukleotide ^{62, 70, 71} da diese aber unter organisch synthetischen Bedingungen nicht sonderlich stabil sind, eine orthogonale Linker- und Schutzgruppenstrategie verlangen und zudem die beiden SyntheseprozEDUREN kompatibel sein

müssen, haben sie sich nicht durchsetzen können und es wurden beispielsweise polyhalogenierte Kohlenwasserstoffe eingesetzt, die nach photolytischer Abspaltung vom Träger mittels GC oder MS in sehr niedrigen Konzentrationen noch analysiert werden können ⁷². Eine weitere Methode zur Herstellung eines nichtsequentiellen Codes ist die Verknüpfung von halogenierten Arenen mit dem Bead durch die $\text{Rh}(\text{tfa})_2$ katalysierte Carbeninsertion über Alkoxy Spacer ⁷³. Die kodierenden Aryloxyalkohole werden oxidativ abgespalten und nach Silylierung mittels GC analysiert. An-, bzw. Abwesenheit eines „tags“ codieren für 1 bzw. 0 in der Binärsequenz. Weiter wurden auch nichtchemische Codes, nämlich Speicher-Chips eingesetzt, die in den Harzpartikeln oder Tea-Bags eingebettet sind und während der Synthese mit Hochfrequenzsignalen beschrieben werden ^{74, 75, 76}.

1.4.5.1 Photolithographische Synthese von Bibliotheken ⁷⁷

Mit lithographischen Masken und photolabilen Schutzgruppen (z.B. Nitroveratryloxycarbonyl-) wurde von Fodor et al. ⁷⁷ die multiple parallele Synthese von Peptid- und Oligomerbibliotheken auf funktionalisierten Glasoberflächen oder Siliciumwafern entwickelt (**Figur 11**). Die Lage der Endprodukte auf der Oberfläche ist durch das Muster der angewendeten Masken und der Abfolge der Reaktanden bestimmbar.



Figur 11. Prinzip der photolithographischen Synthese von Verbindungen auf einer festen Oberfläche.

Nach der Reaktion und Entschützung der letzten Komponente kann die Bibliothek mittels eines Affinitätsassays nach aktiven Verbindungen gescreent werden und diese nach ihrer räumlichen Anordnung identifiziert werden.

1.4.5.2 Die „Phage Display“-Methode 78, 79, 80, 81

Mittels der „Phage-Display“-Methode können auf zellbiologischem Weg M13-Bakteriophagen so manipuliert werden, dass sie auf ihrer Oberfläche zusätzliche Peptide darstellen. Die Grundlage dazu ist der glückliche Zufall, dass zwei der Hüllproteine („coat proteins“) dieser „filamentous phage“, das „major protein“, codiert durch das Gen VIII und das „minor protein“, codiert durch das Gen III, oberflächenorientierte N-terminale Domänen besitzen, die fremde Peptidinsertionen tolerieren. Um eine Bibliothek herzustellen, werden zufällige Oligonucleotide in den Genen III und VIII des Phagengenoms geklont. Diese Sequenzen im mutierten Genom codieren für alle möglichen Peptide, entsprechend der Anzahl zufällig entstandener Triplet-Codons. Durch Transfektion in E. coli-Bakterienstämme werden die Phagen vermehrt und diese bilden dann Peptidsequenzen aus, die mit den Hüllproteinen pIII und pVIII verschmolzen sind.

Das Screening geschieht durch einen Schritt namens „panning“, bei dem die Phagen mittels einem immobilisierten Liganden auf ihre Affinität getestet werden. Phagen, die nach dem Selektionsprozess und dessen verschiedenen Selektionskriterien (Eluierungskonditionen, kompetitive Liganden) noch gebunden sind, werden eluiert, vermehrt und einem weiteren Selektionszyklus unterzogen. Nach mindestens drei Anreicherungszyklen können die Peptidsequenzen der bindenden Phagen durch Sequenzierung der relevanten DNA-Regionen auf den Genen III und VIII bestimmt werden.

Der Vorteil dieses biochemischen Ansatzes liegt darin, dass man die leistungsfähige Proteinbiosynthese für sich arbeiten lässt. Zudem kann man sich der ausgefeilten Protein- und DNA-Synthesetechnik bzw. Analysetechnik zur Charakterisierung der „Hits“ bedienen. Der Nachteil liegt in der molekularen Vielfalt, die in diesem Ansatz auf die nur 20 natürlichen L-Aminosäuren beschränkt ist. Als Leitstrukturen resultieren demzufolge nur Peptide.

1.4.6 „Klassische“ Analysemethoden auf der festen Phase

Ein Hauptproblem der Chemie an Festphase stellt die Analytik der Substanzen am Harz dar. Die herkömmlichen standardisierten Analysemethoden wie IR, ^1H -NMR und MS können insofern für die Charakterisierung oder Reaktionskontrolle verwendet werden als diese für die Analyse von Harzgebundenen Substanzen optimiert worden sind. Im Folgenden sind die gebräuchlichsten Anwendungen für die Analyse von harzgebundenen Substanzen dargestellt.

1.4.6.1 Massenspektrometrische Methoden

- MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight - Mass Spectrometry)

Es wurde gezeigt, dass Peptide, die über einen photolabilen Linker ans Harz gekoppelt sind, ohne vorherige chemische oder photochemische Behandlung direkt im MALDI-TOF-MS analysiert werden können ^{82, 83}, indem einige Beads direkt auf eine geeignete Matrix gegeben werden. Die aufgewendete Laserenergie spaltet dabei die Verbindungen von der Festphase und wirkt gleichzeitig als Ionisationsenergie.

- ESI-MS (Electron Spray Ionisation) und Tandem-MS

Die einfachste und technisch am wenigsten anspruchsvolle Art, Zwischenprodukte oder Endprodukte einer Festphasensynthese zu analysieren ist, nach vollendeter Synthese, die Substanz chemisch oder photochemisch (je nach Linker) von einem Aliquot Harz abzuspalten (mg-Bereich) und die abgespaltene Lösung zu messen.

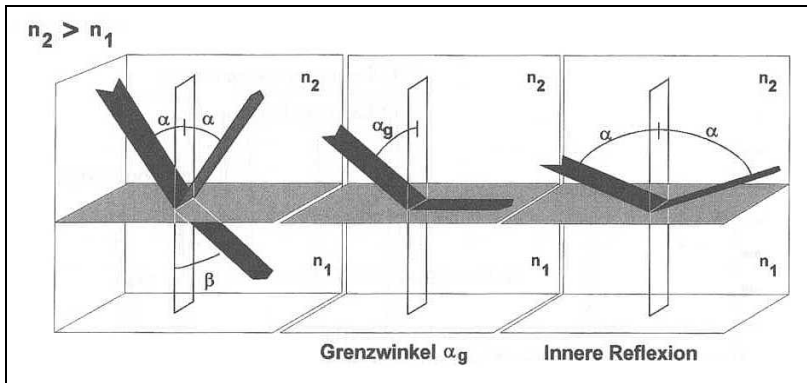
1.4.6.2 ATR-Infrarot-Spektroskopie

Die ATR („Attenuated Total Reflection“-)IR-Spektroskopie gehört zu den Methoden der Reflexionstechniken, die in der letzten Zeit dank grösserem Rechnereinsatz und starker Empfindlichkeitssteigerung erheblich an Bedeutung gewonnen haben. Reflexion wird an allen Grenzflächen zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes beobachtet. Bei der inneren Reflexion betrachtet man den Übergang der Strahlung vom optisch dichteren (n_2) zum optisch dünneren (n_1) Medium, wobei wie im umgekehrten Fall Reflexion und Brechung beobachtet wird. Tritt ein Strahl mit einem Winkel von $\alpha < \alpha_g$ auf, tritt Brechung auf, bei $\alpha = \alpha_g$ tritt das gebrochene Licht streifend aus und bei $\alpha > \alpha_g$ beobachtet man (innere) Reflexion (**Figur 12**). Für den Grenzwinkel der Totalreflexion gilt **Gleichung 3**

$$\sin \alpha_g = \frac{n_1}{n_2}$$

α_g = Grenzwinkel der Totalreflexion
 n_1 = Brechungsindex des optisch dünneren Mediums
 n_2 = Brechungsindex des optisch dichteren Mediums
Gleichung 3

Trotz Totalreflexion tritt aber der Strahl auch ins optisch dünnere Medium ein. Nach **Gleichung 4**⁸⁴ für die Eindringtiefe ist diese abhängig von der Wellenlänge und/oder dem Einfallswinkel α . Wenn das optisch dünnere Medium mit der eindringenden Strahlung in Resonanz tritt (Absorption), wird die total reflektierte Strahlung um die absorbierte Energie abgeschwächt, was man „abgeschwächte Totalreflexion“, ATR (Attenuated Total Reflection) nennt.



Figur 12. Die verschiedenen Reflexionsarten beim Eindringen von Licht aus optisch dichterem Medium in optisch dünneres, mit Eintrittswinkeln, die kleiner ($\alpha < \alpha_g$), gleich ($\alpha = \alpha_g$) und grösser ($\alpha > \alpha_g$) als der Grenzwinkel der Totalreflexion sind⁸⁵.

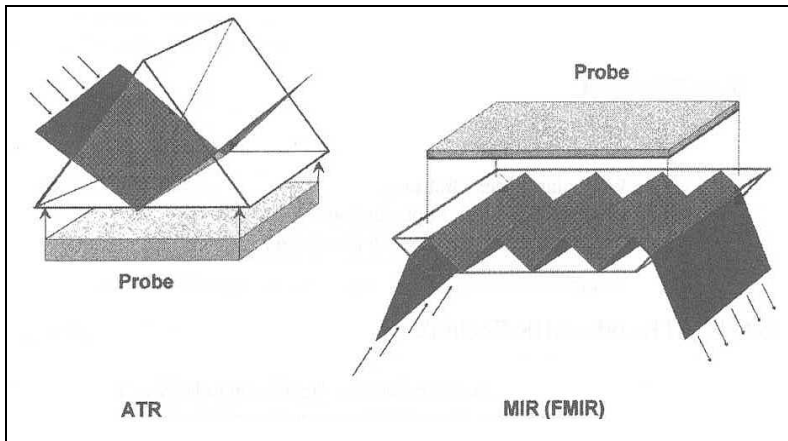
$$dp = \frac{\lambda}{2 \cdot \pi \cdot \sqrt{\sin^2 \alpha - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}}$$

d_p = Eindringtiefe
 α = Einfallswinkel
 λ = Wellenlänge

Gleichung 4

In der Praxis bringt man die zu untersuchende Probe in optischen Kontakt mit einem Kristall, der einen höheren Brechungsindex als die Probe besitzt (KRS-5, ZnSe, Ge), wobei je nach Problemstellung unterschiedliche Spektralbereiche, Brechungsindizes und chemische und physikalische Eigenschaften zur Auswahl stehen.

Bei der klassischen ATR-Technik werden die Proben mit prismenförmigen Kristallen in Kontakt gebracht, bei der heute üblichen MIR- bzw. FMIR-Technik (Frustated Multiple Internal Reflectance) meist trapezförmige Kristalle mit Mehrfachreflexionen verwendet (**Figur 13**).



Figur 13. Prinzip der klassischen ATR-Technik (links) und der moderneren MIR (FMIR)-Technik (rechts) ⁸⁵.

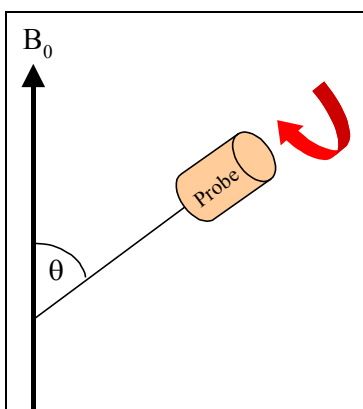
1.4.6.3 Magnetresonanz

- Gelphasen-NMR und MAS-NMR ⁸⁶

Bei der Gelphasen-NMR-Spektroskopie werden normale NMR-Spektren der in deuteriertem Lösungsmittel aufgequollenen Harze aufgenommen. Dabei treten starke Bandenverbreiterungen durch dipolare Kopplungen und chemische Verschiebungsanisotropieeffekte auf. Wegen der grösseren chemischen Verschiebungsdispersion bei ^{13}C -Kernen fallen diese Effekte nicht so stark ins Gewicht wie bei der ^1H -NMR-Spektroskopie.

Ein Nachteil dieser Methode sind die sehr lange Messzeit und die grosse Bandenbreite der Polymersignale. Aus diesem Grund werden heute modernere Methoden wie die HSQC- (Heteronuclear Single Quantum Coherence-) Spektroskopie für ^{13}C -Kerne und die MAS- (Magic Angle Spinning-) Spektroskopie für ^1H -Kerne angewendet.

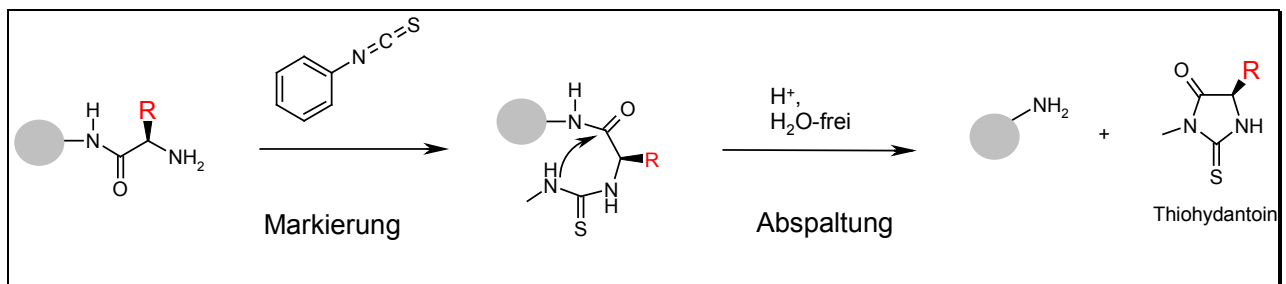
Um die Probleme der Linienverbreiterung weitgehend zu eliminieren, wird die Probe schnell um den „magischen Winkel“ von 54.7° relativ zum äusseren Magnetfeld rotiert. Die Spinning-Frequenzen bewegen sich im kHz-Bereich (**Figur 14**).



Figur 14. Prinzip der Messanordnung für MAS-NMR

1.4.7 Identifikation von Peptidsequenzen mittels Edman-Abbau ^{87, 88, 89}

Mit Hilfe des Edman-Abbaus ist es möglich, die Aminosäurekomponenten von Peptiden vom Aminoterminus her zu bestimmen. Mit Phenylisothiocyanat wird die endständige Aminosäure entfernt und der Rest der Peptidkette bleibt intakt (**Schema 3**). Somit kann die Methode repetitiv eingesetzt werden, um sukzessiv die ganze Aminosäuresequenz zu bestimmen. In einem ersten Schritt addiert der Aminoterminus der Aminosäure an Phenylisothiocyanat zum N-Phenylthioharnstoff-Derivat. In einem zweiten schwach sauren Schritt cyclisiert der Harnstoff mit der endständigen Aminosäure zu einem je nach Aminosäure anders substituierten N-Phenylthiohydantoinderivat, welches mittels HPLC analysiert wird. Die Peptidkette am Harz ist nun um eine Aminosäure verkürzt. Die Methode ist äusserst empfindlich, ca. 5 nMol reichen für die eindeutige Sequenzierung einer Verbindung aus.



Schema 3. Mechanismus des Edman-Abbaus anhand einer harzgebundenen Komponente

2. Problemstellung

2.1 Konzept eines Screenings mit monoklonalen Antikörpern (mAB) als Rezeptorersatz

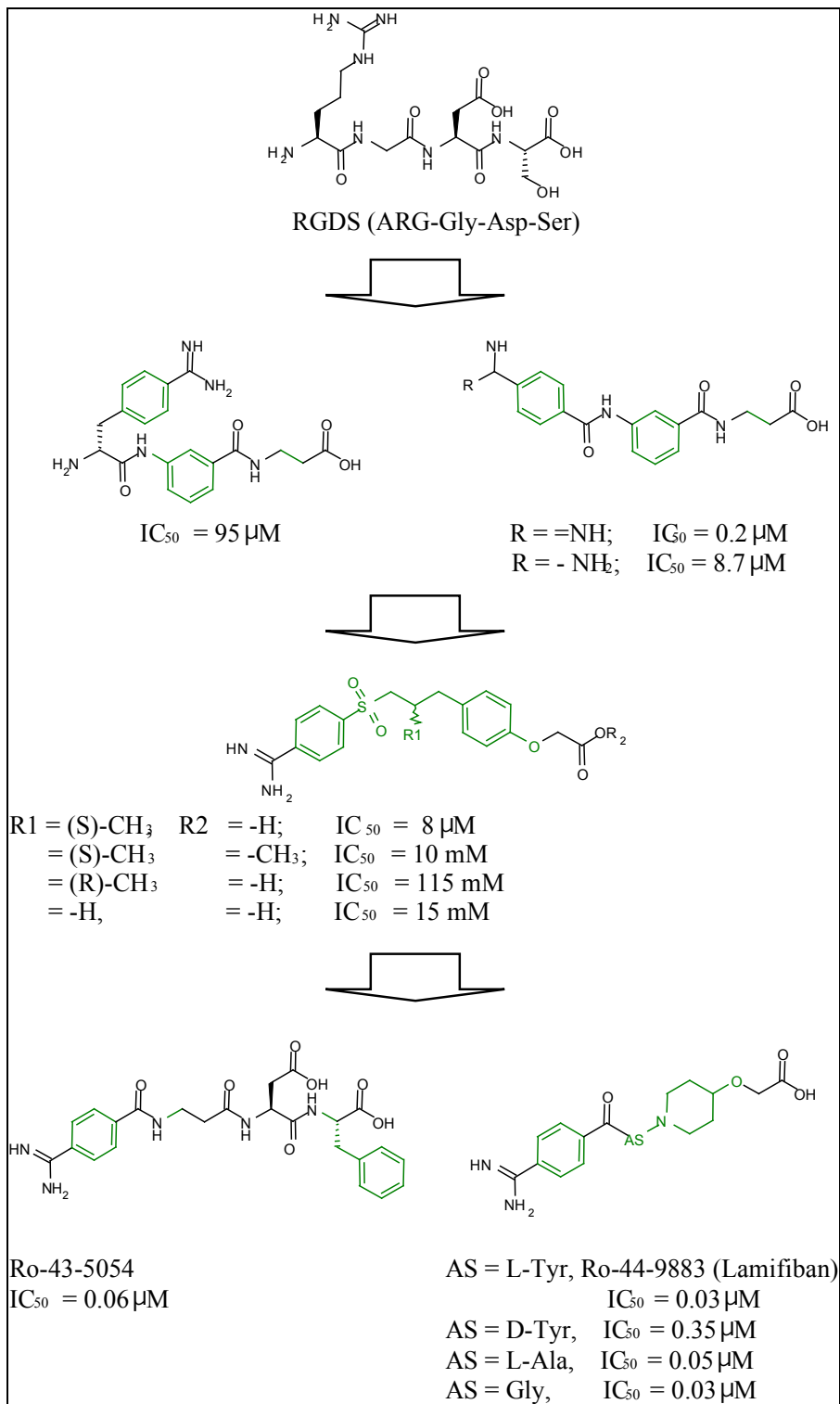
In der vorliegenden Arbeit soll ein neuartiger Ansatz zum Screening und zur Identifizierung von neuen aktiven Substanzen gegenüber einem biologischen Rezeptor evaluiert werden. Die allgemeine Grundlage des Assays stellt ein monoklonaler Antikörper (mAB, „monoclonal antibody“) dar, der gegen ein bereits identifiziertes aktives Substrat gezüchtet wurde. Dieser Antikörper wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (**Figur 18**) und dient als Screeningwerkzeug für Substanzbibliotheken auf Festphasen-Beads. Wegen der Spezifität beider Biomoleküle (Rezeptor und mAB) gegenüber demselben Substrat wird nun erwartet, dass die identifizierten gegen den mAB aktiven Verbindungen auch gegenüber dem biologischen Rezeptor aktiv sind. Der Antikörper sollte sozusagen ein Templat der Umgebung darstellen. Die Idee, mittels eines vorhandenen Moleküls ein Templat zu erstellen, welches dann wiederum als Selektionsinstrument für ähnliche oder gleiche Moleküle dient, ist nicht unbedingt neu. Auch im Gebiet der katalytischen Antikörper^{90, 91} werden Modellverbindungen, in diesem speziellen Fall Übergangszustand-Analoge („Transition State Analogues“) ^{92, 93, 94} verwendet, um einen Antikörper zu züchten, der einen „Abdruck“ dieser Verbindung macht. Diese katalytischen Antikörper dienen dann dazu, Reaktionen zu katalysieren, deren Übergangszustand sterisch und elektronisch der ursprünglichen Modellverbindung ähnelt. Hierbei ist die Güte der katalytischen Aktivität eines identifizierten Antikörpers einerseits abhängig von der Screeningmethode der Antikörper, die von verschiedenen Zelllinien produziert werden, andererseits von der Übereinstimmung/Ähnlichkeit der Modellverbindung mit dem abzubildenden Übergangszustand. Eine noch jüngere Anwendung des Templatkonzeptes ist das Molekulare Prägen („Molecular Imprinting“) ^{95, 96, 97}, bei dem um ein als Matrize wirkendes Molekül in Gegenwart von wechselwirkenden Monomeren vernetzend polymerisiert wird. Nach Abtrennen der Matrize bleibt im Polymer ein Abdruck („Imprint“) zurück, wobei dessen Form und die Anordnung der zur Wechselwirkung befähigten Gruppen komplementär zur Struktur des Matrizenmoleküls sind. Das Polymer kann alsdann als Retentionsmaterial in der Chromatographie eingesetzt werden.

2.2 Lamifiban und der anti-Lamifiban LMF-2-Antikörper

Lamifiban ist ein potenter GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonist, basierend auf der Erkennungspeptidsequenz von Fibrinogen für seinen Blutplättchenrezeptor GPIIb-IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) ⁹⁸. Ersatz des N-terminalen Arginins durch p-Amidinophenylalanin oder des Glycinbausteins durch m-Aminobenzoessäure führte zu aktiveren Verbindungen bezüglich Selektivität und Aktivität.

Durch zufälliges Screening wurden dann verschiedene [(p-Amidinobenzolsulfonamid)ethyl]-p-phenoxyessigsäure-derivate als Fibrinogenrezeptor-Antagonisten identifiziert. Weitere SAR-Studien resultierten in der Identifizierung von N-[N-[N-(p-Amidinobenzoyl)- β -alanyl]-L- α -aspartyl]-3-phenyl-L-alanin und [[1-[N-(p-amidinobenzoyl)-L-tyrosyl]-4-

piperidinyloxy]essigsäure, welche sehr aktive Plättchenaggregations-Inhibitoren sind (IC_{50} 0.06 μ M bzw. 0.03 μ M) (**Figur 15**).



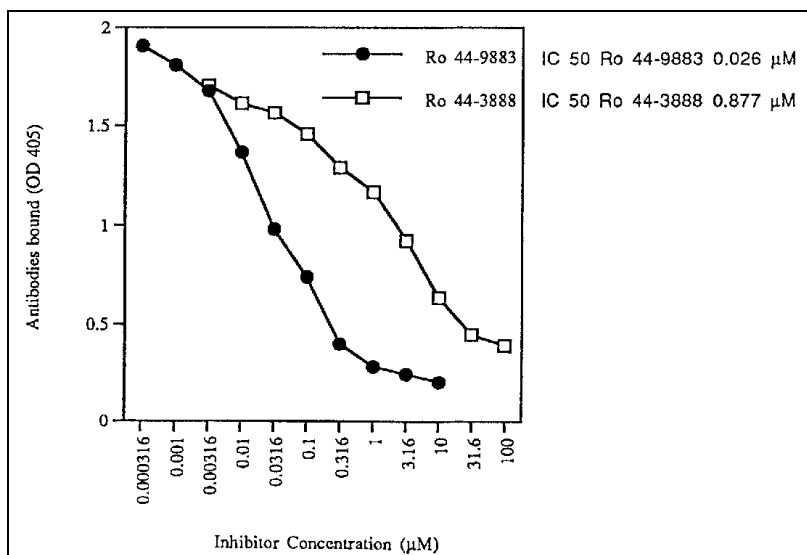
Figur 15. Entwicklungsstufen des GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten Lamifiban

Um ein Antigen für die Immunisierung der Mäuse zu bekommen, wurde ein BSA-Lamifiban-Konjugat hergestellt, bei dem das Lamifiban mittels normaler Peptidkopplungstechniken ohne zusätzlichen Linker ans BSA gekoppelt wurde⁹⁵. Die eptiope Dichte von Lamifiban am BSA betrug 2.3.

Der gegen dieses Antigen gezüchtete mAB zeigt in einem kompetitiven Bindungsassay von an einem BSA – Lamifiban (Ro-44-9883)-Konjugat gebundenem anti-Ro-44-9883 mAB (LMF-2) gegenüber freiem Inhibitor einen IC₅₀ Wert von 26 nM (**Figur 16**).

Gegenüber der RGDS-Sequenz, die am GPIIb/IIIa-Rezeptor bindet, zeigt der LMF-2 Antikörper keine Aktivität, hingegen zeigt der Rezeptor einen IC₅₀-Wert von 3.7 µM gegenüber dieser Sequenz.

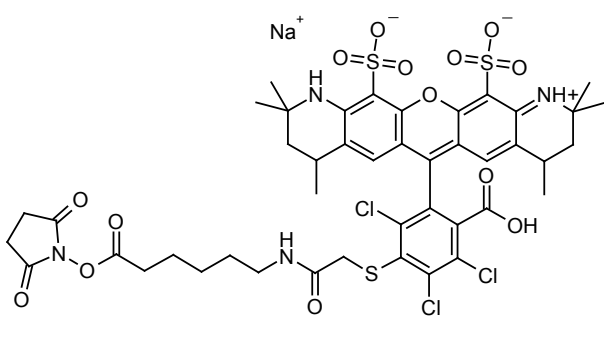
Die tatsächlichen Affinitätskonstanten des Antikörpers LMF-2 gegenüber Lamifiban (Ro 44-9883) und Ro 44-3888), die mittels BiaCore-Messungen ermittelt wurden, betragen $2.7 \cdot 10^{-9}$ M bzw. $1.8 \cdot 10^{-9}$ M.



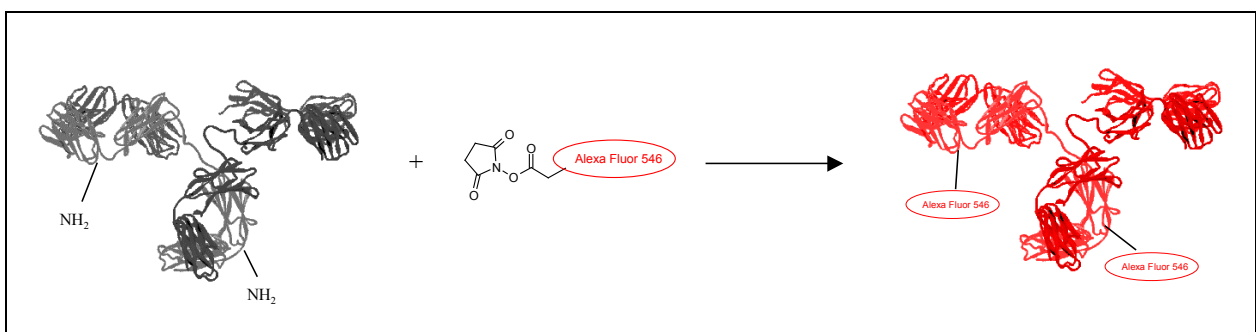
Figur 16. Kompetitiver Bindungsassay von anti-Ro-44-9883 Antikörpern auf BSA-Lamifiban-Konjugat gegenüber Lamifiban (Ro 44-9883) und Ro 44-3888⁹⁹.

2.2.1 Fluoreszenzmarkierung des LMF-2-Antikörpers

Der monoklonale anti-Lamifiban-Antikörper LMF-2 wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff auf Rhodaminbasis (**Figur 17**) von Molecular Probes¹⁰⁰ markiert (**Schema 4**). Der als Succinimidester aktivierte Farbstoff wird unspezifisch an die Aminfunktionalitäten der Lysinseitenketten am Antikörper gekoppelt.

| | |
|---|--|
|  | <p>Daten für Alexa Fluor® 546 Fluorescence Dye</p> <ul style="list-style-type: none"> • $M = 1079.39$ • $\lambda_{\text{abs}} = 558 \text{ nm}$; $\epsilon = 104'000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ • $\lambda_{\text{em}} = 573 \text{ nm}$ <p>pH-Bereich für Fluoreszenz: pH 4 – pH 10</p> <ul style="list-style-type: none"> • gut wasserlöslich • photostabil |
|---|--|

Figur 17. Der als N-Succinimidester aktivierte Fluoreszenzfarbstoff Alexa 546 und seine physikalischen Daten



Schema 4. Markierung des mAB mit Succinimidester des Fluoreszenzfarbstoffes Alexa-Fluor 546

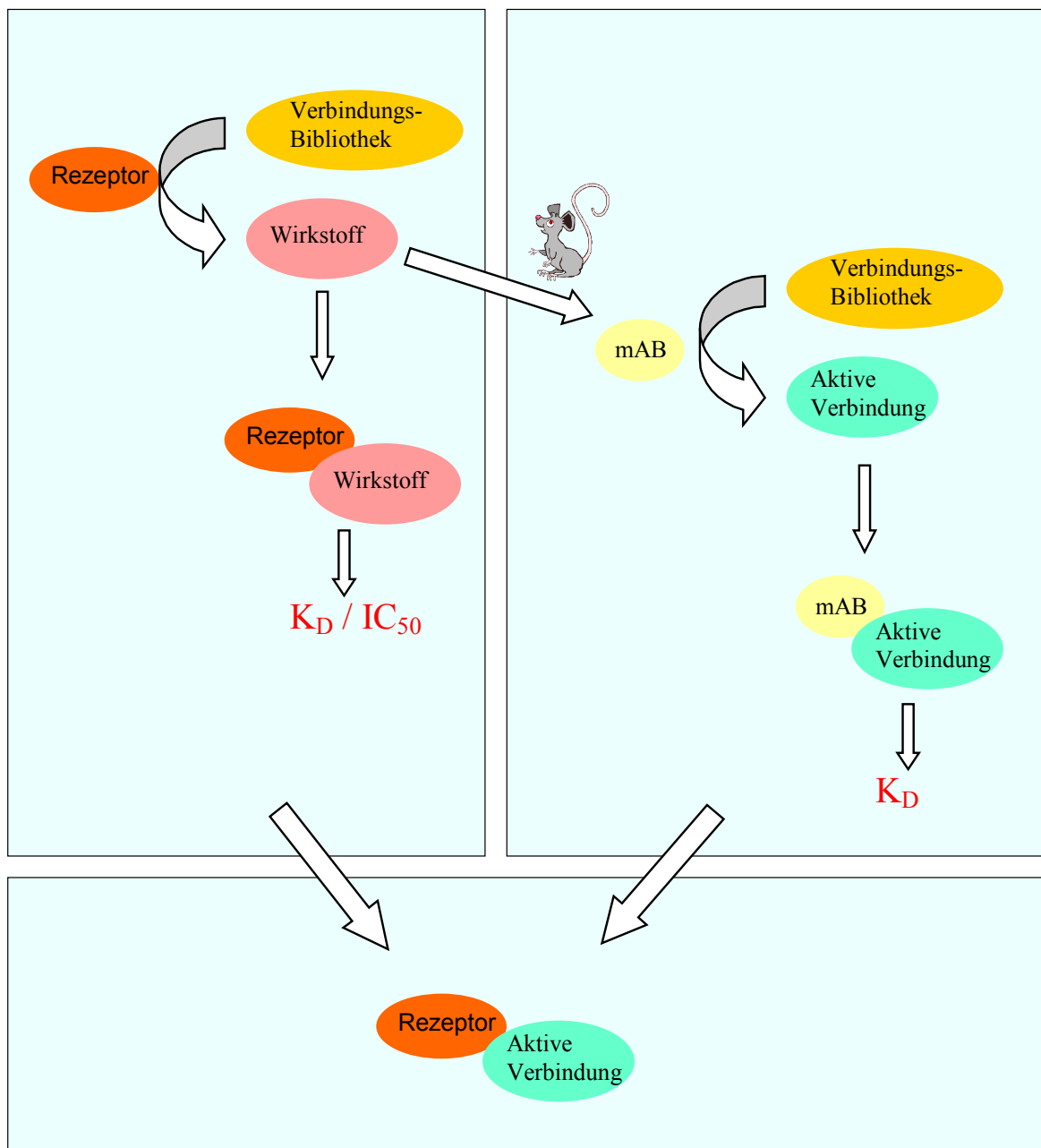
Die Proteinkonzentration des mAB in Lösung und die epitope Dichte des Fluoreszenzfarbstoffes auf dem mAB wurde mittels UV-Messung bei 280 nm bzw. 558 nm berechnet (vgl. **9.10**). Die Ausbeute an fluoreszenzmarkiertem mAB betrug normalerweise ca. 80 % und die epitope Dichte lag reproduzierbar bei 2.5 Farbstoffmolekülen/mAB-Molekül.

2.3 Ansätze zur Untersuchung des Konzeptes

Mittels verschiedener Ansätze soll gezeigt werden, dass ein monoklonaler Antikörper als Rezeptorersatz dienen kann und dass das Prinzip, dass ein Rezeptor durch einen als Templat dienenden mAB ersetzt werden kann, funktioniert.

- Ein Screening von Tetrapeptidbibliotheken, die in Split & Mix-Technik auf Festphasen-Beads hergestellt werden, mit dem fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörper LMF-2 von Roche, soll zeigen, dass der mAB aktive Moleküle selektionieren kann. Die ausgewählten Tetrapeptide werden auch am Rezeptor getestet, um die Korrelation der Bindung am mAB und am Rezeptor aufzuzeigen.

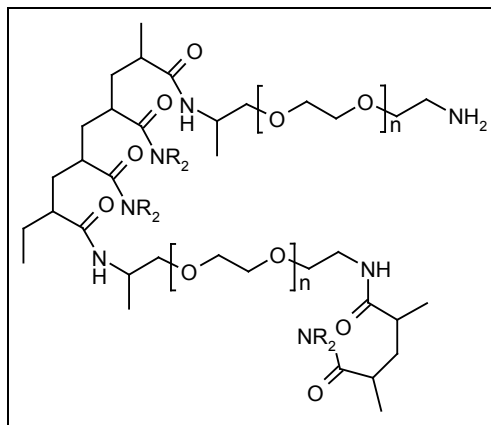
- Eine statistische Auswertung der Bindungsaffinitäten von einigen bekannten Verbindungen, die kovalent auf Festphasen-Beads gebunden sind, gegenüber dem mAB und quantitative Messungen der Affinitäten (K_D -Werte) dieser Verbindungen gegenüber dem mAB mittels BiaCore sollen einen weiteren Beweis für die Anwendbarkeit dieser Methode liefern.
- Schliesslich sollen in parallel-Arbeitsweise Lamifiban-ähnliche Verbindungsbibliotheken hergestellt und mit dem LMF-2 mAB gescreent werden, so dass eine Art Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR, „structure-activity-relationship“) aufgestellt werden kann.



Figur 18. Prinzip der Screeningmethode mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern. Gegen einen vorhandenen Wirkstoff wird ein monoklonaler Antikörper hergestellt, welcher dann als Screening-Werkzeug für „one-bead-one-compound“-Bibliotheken benutzt wird.

2.3.1 PEGA-Harz und seine Eigenschaften¹⁰¹

Die Wahl des Harzes für die Festphasensynthesen und das nachfolgende Screening mit monoklonalem Antikörper fiel auf das PL-PEGA-Harz (Polymer Laboratories Ltd., Acryloylated poly(ethylenglycol)bis(aminopropyl ether) Copolymer) (**Figur 19**). PEGA ist ein hydrophiles Harz, welches sehr gut zugänglich für ein sehr breites Spektrum von Lösungsmitteln ist. In polaren Lösungsmitteln (z.B. DMF, NMP, H₂O) quillt das Harz sehr stark auf. Die offene Struktur dieses Harzes im gequollenen Zustand lässt die Diffusion von grossen Biomolekülen wie Enzymen, Antikörpern u.a., mit einem Molekulargewicht von bis zu 70 kD zu. Es wurde das Harz mit 0.2 mMol/g Beladung gewählt. Die Partikelgrösse beträgt 300 – 500 µm in gequollenem Zustand. Ein Gramm Harz entsprechen ca. 500'000 Beads.

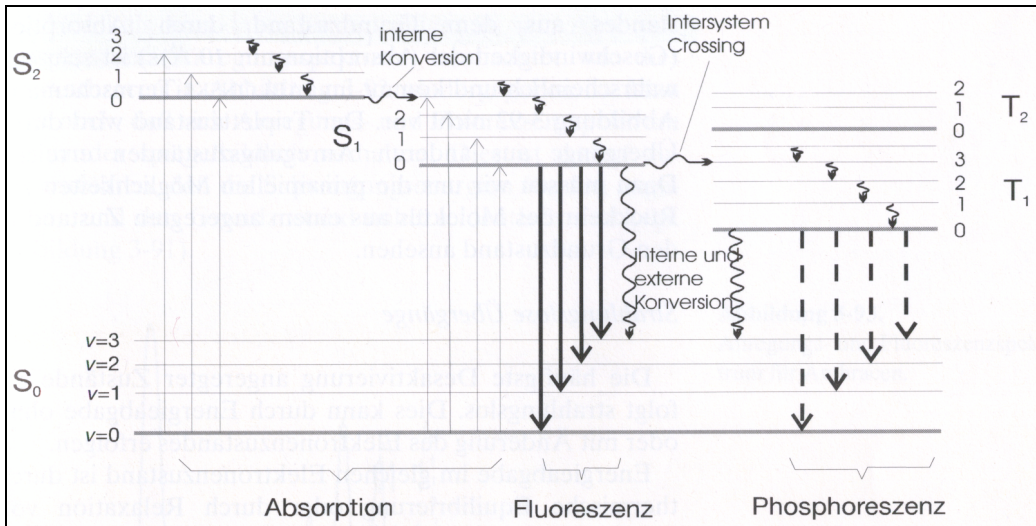


Figur 19. Struktur des Polyethylenglycol-Acrylamid-Copolymers PEGA

3. Fest-Phasen-Assay mit fluoreszenzmarkiertem mAB

3.1 Grundlagen der Fluoreszenz

Die Fluoreszenz gehört mit der Phosphoreszenz zu den Emissionsphänomenen, die aufgrund von Photonenabsorptionen entstehen (Photolumineszenz). Die molekulare Fluoreszenz kann anhand eines Jablonski-Termschemas in **Figur 20** veranschaulicht werden. Darin sind die relevanten elektronischen (S = Singulett, T = Triplett) und vibratorischen Niveaus ($v = 0, 1, 2, 3$) dargestellt, die bei den verschiedenen Elektronenzustandsänderungen beteiligt sind. Die häufigste Deaktivierung angeregter Zustände erfolgt strahlungslos ohne Änderung des Elektronenzustandes (thermische Equilibrierung, Relaxation) oder mit Änderung des Elektronenzustandes (interne Konversion, externe Konversion, Intersystem Crossing). Als Übergänge von angeregten Zuständen in den Grundzustand unter Emission von Licht sind die Fluoreszenz und Phosphoreszenz wichtig. Die Fluoreszenz ist einem Übergang aus einem angeregten Singulettzustand in den niedrigsten Grundzustand zuzuordnen $S_1 \rightarrow S_0$. Die Lebensdauer dieser Übergänge liegt bei 10^{-9} bis 10^{-7} Sekunden, sie werden im Gegensatz zur Phosphoreszenz nur während der Anregungsperiode beobachtet. Wie **Figur 20** entnommen werden kann, ist die Energie der Fluoreszenzübergänge geringer als jene der Absorptionsübergänge, somit ist das Fluoreszenzspektrum längerwellig als sein Absorptionsspektrum. Die Energie der Fluoreszenzvorgänge ist geringer als diejenige der Absorptionsvorgänge.



Figur 20. Jablonski-Termschema zur Veranschaulichung von Absorptions- und Emissionsvorgängen in einem Molekül¹⁰²

Anders als bei der UV/VIS-Spektroskopie hängt die Intensität der Fluoreszenz I_F neben der Intensität des eingestrahlten Lichtes I_0 zusätzlich von der Fluoreszenzquantenausbeute Q ab:

$$Q = \frac{n}{m}$$

Q = Quantenausbeute
n = Anzahl als
Fluoreszenz emittierte
Protonen

m = Anzahl
absorbierte
Protonen

Gleichung 5

Für sehr verdünnte Lösungen gilt vereinfacht das modifizierte Beer-Lambertsche Gesetz:

$$I_F = QI_0 \epsilon d c$$

c = Konzentration in mol L⁻¹

d = Schichtdicke in cm

ε = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient in L
mol⁻¹ cm⁻¹

Gleichung 6

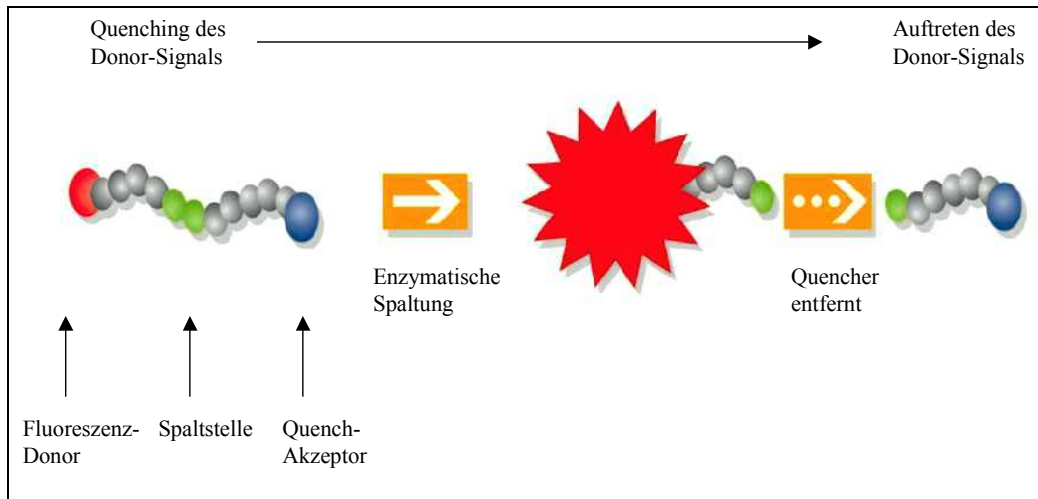
Wichtig ist, zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Intensität der anregenden Strahlung ist.

Der lineare Zusammenhang gilt bei Fluoreszenzmessungen in einem wesentlich grösseren dynamischen Konzentrationsbereich von bis zu drei Dekaden, 10⁻⁷ bis 10⁻⁴ M. Bei Konzentrationen > 10⁻⁴ M verlaufen die Kalibrationskurven nicht mehr linear, Grund dafür sind Auslöscheffekte („Quenching“) oder Selbstabsorption.

3.2 Anwendungen in der Wirkstoffsuche - FRET

Fluoreszenzassays sind um einen Faktor 10² – 10³ empfindlicher als Messungen, die auf UV/VIS-Messungen beruhen. Gegenüber Assays mit radioaktiv markierten Liganden (RIA = „Radio Immuno Assay“) haben sie den Vorteil, dass notwendige Vorsichts- und Entsorgungsmassnahmen entfallen und sie eine ähnliche Sensitivität aufweisen. Der überwiegende Teil der Screeningverfahren weltweit wird mit immunochemischen Methoden auf Fluoreszenzbasis (EIA = „Enzyme Immuno Assay“; FPIA = Fluorescence Polarisation Immuno Assay“ u.ä.) durchgeführt, da diese rasch zu Resultaten führen und auch in kleinen Labors gut praktikabel sind¹⁰³. Eine sehr effiziente und empfindliche Methode für Fluoreszenzassays ist die FRET-Methode.

FRET-Assays (FRET = „Fluorescence Resonance Energy Transfer“) beruhen auf einem Energietransfer zwischen zwei Farbstoffen, einem Fluoreszenzdonor und einem –akzeptor und ist wahrscheinlich die leistungsfähigste aller Fluoreszenztechniken. Das FRET-Prinzip ist in **Figur 21** dargestellt. FRET ist eine distanzabhängige Interaktion zwischen den elektronisch angeregten Zuständen zweier Farbmoleküle, bei der die Anregung vom Donor zum Akzeptor transferiert wird, ohne dass ein Photon emittiert wird.



Figur 21. FRET-Prinzip ¹⁰⁴. Durch enzymatische Spaltung eines Peptids werden Fluoreszenzdonor und –Akzeptor, die sich an den beiden Enden des Moleküls befinden, voneinander getrennt und das Fluoreszenzquenching wird aufgehoben.

Ein Terminus des Peptids ist mit einem Fluoreszenzdonor, der andere Terminus mit einem Fluoreszenzakzeptor markiert. Die beiden Farbmoleküle sollten sich in einer Distanz von 10 – 100 Å befinden. Das Absorptionsspektrum des Akzeptors muss mit dem Emissionsspektrum des Fluoreszenzdonors überlappen. Während des Energietransfers, also in intaktem Zustand, wird das Donorsignal so wirksam vom Akzeptor gequenchet. Werden als Donor und Akzeptor zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, kann FRET durch Auftreten von „sensitized“ Fluoreszenz des Akzeptors oder durch das Quenching der Donorfluoreszenz nachgewiesen werden. Sind Donor und Akzeptor dasselbe Molekül, kann FRET durch Fluoreszenzpolarisation detektiert werden ¹⁰⁵. Nichtfluoreszierende Akzeptoren wie Dabsyl haben den besonderen Vorteil, dass keine Hintergrundfluoreszenz durch direkte Akzeptor-Anregung auftritt. Solche Kombinationen sind primär zur Detektion von Proteolysen ^{106, 107} und Nukleinsäurehybridisierung entwickelt worden ^{108, 109}. Weitere Anwendungen der FRET-Technologie sind z.B. Untersuchungen zu Rezeptor/Ligand –Interaktionen ¹¹⁰, Immunoassays ¹¹¹, automatischem DNA-Sequenzierung ¹¹² oder Membran-Fusions-Assays ^{113, 114}.

Bei der Entwicklung von FRET-Assays sind aber einige Punkte zu berücksichtigen:

- Zwei zusätzliche Markierungsreaktionen sind notwendig.
- Durch sterische Effekte kann der Fluoreszenzmarker die biologische Aktivität des Liganden/Substrats stören.
- Selektive Markierung von grösseren Proteinen ist nicht möglich, was zu unspezifischen Wechselwirkungen und unbekannten Orientierungen der Donor – und Akzeptormoleküle führen kann.
- Fluoreszenzfarbstoffe sind anfällig auf Umweltfaktoren wie Licht, Temperatur – und pH-Schwankungen, sowie Anwesenheit von DMSO.

3.3 Physikalische Grundlagen für Absorptions-Assays

Für die Adsorption eines Moleküls/Liganden (in unserem Fall eines mAB) an Oberflächen wurde von Chen und Frank ¹¹⁵ ein Modell entwickelt, das dem Langmuir'schen Kinetikmodell gehorcht. Unter Vernachlässigung eines Widerstandes durch Diffusion der Massen kann die Adsorption als ein Vorgang auf einer idealen Oberfläche beschrieben werden, bei dem Oberflächen-Plätze aufgefüllt/besetzt werden, und die Adsorption und Desorption können als sich entgegenwirkende Schritte betrachtet werden. Zudem ist anzunehmen, dass der Adsorptionsschritt geschwindigkeitsbestimmend ist, da die Konzentration in Lösung viel grösser ist als auf der Oberfläche. Daraus folgt:

$$\frac{d\theta}{dt} = \left(\frac{k_a}{N_0} \right) c (1 - \theta) - \left(\frac{k_d}{N_0} \right) \theta \quad \text{Gleichung 7}$$

wobei θ den Oberflächenbeladungsquotienten

t die Adsorptionszeit

k_a und k_d die Adsorptions- und Desorptionskonstanten (on- und off-rates)

N_0 die Oberflächenkonzentration bei voller Beladung und

c die Konzentration des Liganden in Lösung darstellen.

Integration der obigen Gleichung mit der Anfangsbedingung $\theta = 0$ führt zu der Gleichung

$$\theta = \left(\frac{k_a c}{k_a c + k_d} \right) \left[1 - e^{-\frac{k_a}{N_0 \left(c + \frac{k_d}{k_a} \right)} t} \right] \quad \text{Gleichung 8}$$

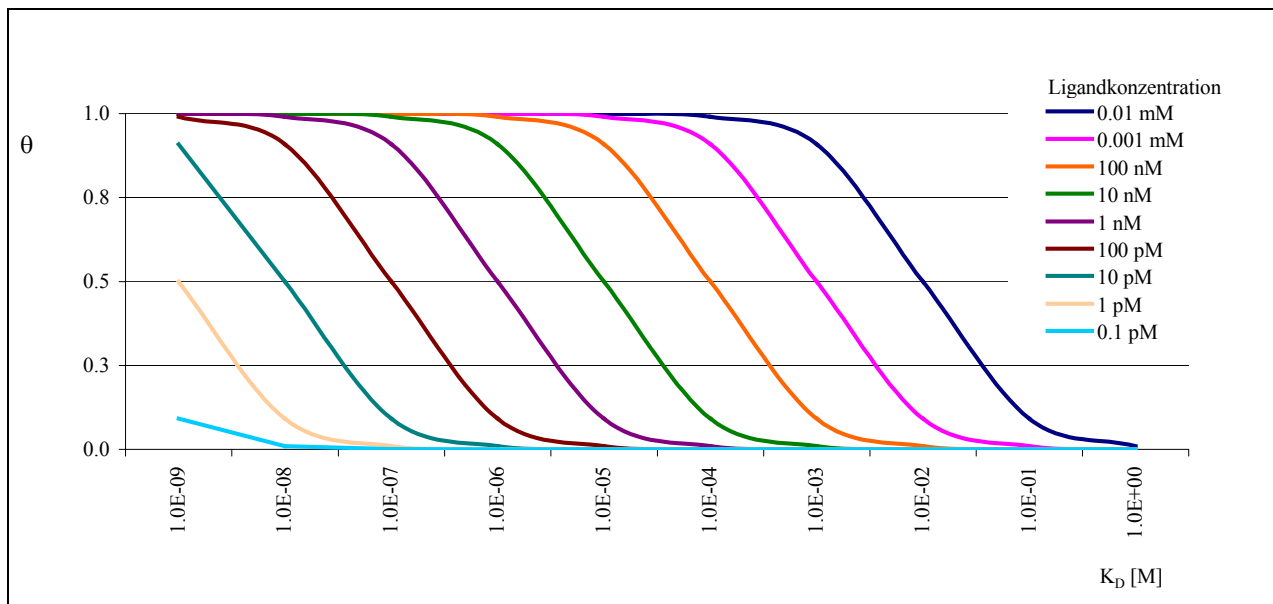
welche zur Langmuir Adsorptions-Isotherme im **Gleichgewicht** ($t \rightarrow \infty$) reduziert werden kann

$$\theta_{eq} = \frac{k_a c}{k_a c + k_d} = \frac{c}{c + K_D} \quad \text{Gleichung 9}$$

$$\text{dabei gilt: } K_D \equiv \frac{k_d}{k_a} \propto e^{\frac{\Delta G_a^\circ}{RT}}$$

ΔG_a° = freie Adsorptionsenergie bei
unendlicher Verdünnung

Gleichung 10



Figur 22. Langmuir-Isotherme für verschiedene Konzentrationsbereiche in einem idealen System. Abhängig von der Konzentration an Ligand in der umgebenden Lösung, ändert sich der durch die Sättigung θ an der Oberfläche abgedeckte Bereich, der für die Beobachtung einer Bindung/Affinität zur Verfügung steht.

Berechnet man anhand **Gleichung 9** einige Abhängigkeiten der „Sättigung“ θ eines Rezeptors auf der Oberfläche von der Gleichgewichtskonstanten (K_D), erhält man, für verschiedene Konzentrationen an Ligand in der umgebenden Lösung die Langmuir-Isothermen wie sie in **Figur 22** dargestellt sind. Bei einer hohen Konzentration an Ligand (mM-Bereich) wird die Oberfläche auch abgesättigt, wenn die Affinitätskonstante K_D vom Liganden an den Rezeptor auf der Oberfläche ziemlich klein ist und es können keine Differenzen im Bindungsverhalten von hochaffinen Liganden nachgewiesen werden (z.B. können bei einer Konzentration von 1 mM an Ligand nur Affinitätswerte im Bereich 10^{-4} M bis 10^{-1} M nachgewiesen werden). Hingegen werden bei niedriger Konzentration an Ligand, auch bei einer hohen Affinität gegenüber dem Rezeptor, nicht alle Bindungsplätze belegt (10 pM, 1 pM, 0.1 pM). Je kleiner die Konzentration der Ligandenlösung desto mehr verschiebt sich somit der beobachtete Bereich in die hochaffine Region (10^{-6} – 10^{-9} M).

3.4 Übertragung und Optimierung des Konzeptes auf Festphase

Um einen Eindruck von den Bindungs-/Screeningeigenschaften von einem mAB auf PEGA-Harz zu bekommen, wurde die Roche-Verbindung Lamifiban, gegen die der monoklonale Antikörper LMF-2 gezüchtet wurde, an PEGA-Harz gebunden und drei je gleich grosse Aliquote (ca. 50 Beads à $0.2 \text{ nMol} \approx 10 \text{ nMol}$) dieses Harzes unterschiedlich lange (1 bis 24 h) und mit verschiedenen Konzentrationen an fluoreszenzmarkiertem anti-Lamifiban mAB ($100 \mu\text{l}$ an $10 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ und $0.1 \mu\text{M}$ Lösungen) inkubiert. Einige Beads von jedem Inkubationsansatz wurden dann mittels Fluoreszenzmikroskop mit CCD („Charge Coupled Device“)-Kamera fotografiert. Die Bilder sind in **Tabelle 6** dargestellt.


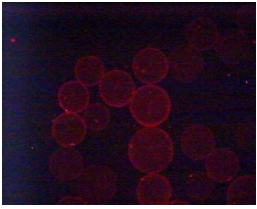
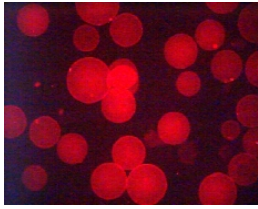
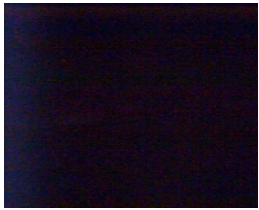
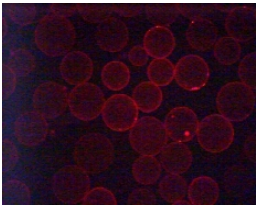
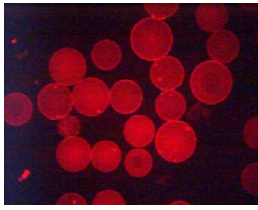

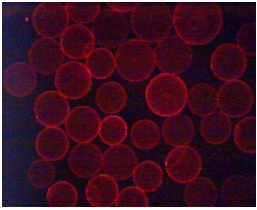
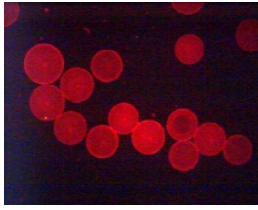

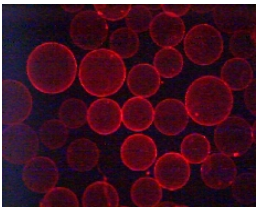
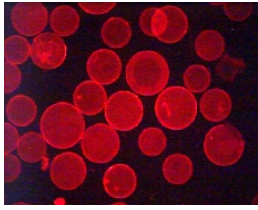
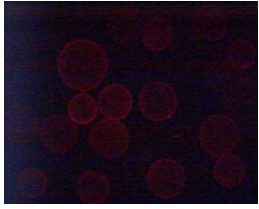
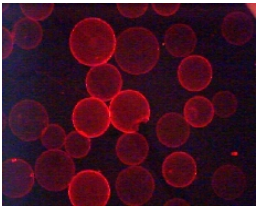
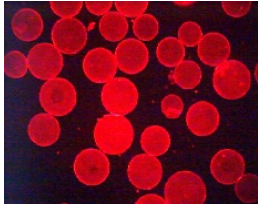
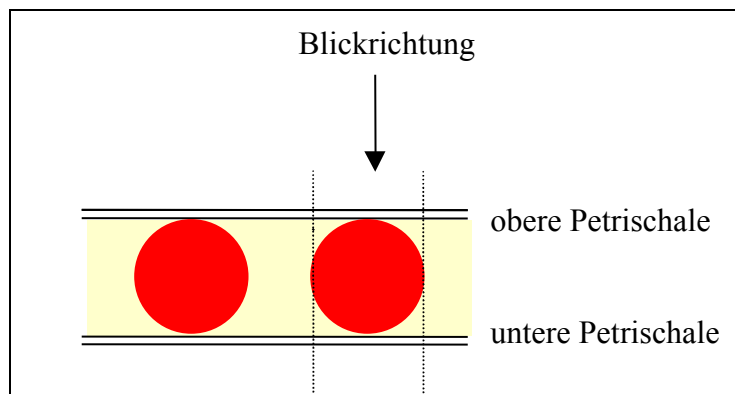
| t _{Inkubation} | mAB-Unterschuss gegenüber Substanzmenge auf den Beads | | |
|-------------------------|---|---|---|
| | ca. 1000 fach | ca. 100 fach | ca. 10 fach |
| 1 h |  |  |  |
| 2 h |  |  |  |
| 4 h |  |  |  |
| 7 h |  |  |  |
| 24 h |  |  |  |

Tabelle 6. Darstellung einer Verdünnungs- und Inkubationsreihe von Lamifiban-PEGA-Beads mit LMF-2 anti-Lamifiban-mAB.

Vergleicht man die drei Inkubations-Ansätze ist eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzantwort sichtbar, wobei der Zeitfaktor der Inkubation eine weniger grosse Rolle zu spielen scheint, als die Konzentration der Antikörperlösung. Bei der höchsten Konzentrationen sind die Leuchtwerte bei allen Proben etwa gleich gross, bei der mittleren Probe ist eine eindeutige Zunahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit festzustellen und bei der Probe mit sehr verdünnter mAB-Lösung ist erst nach 24 h eine leichte Zunahme der Fluoreszenz festzustellen.

Um die Theorie und die Zuverlässigkeit eines „on-bead“-Assays zu überprüfen, wurde eine Methode entwickelt, bei der die Probleme der „Single-Bead“-Identifikation vermieden wurden. Es wurden jeweils mehrere Beads, die nur eine Verbindung enthielten, statistisch ausgewertet. Der Ablauf dieses Screenings ist wie folgt:

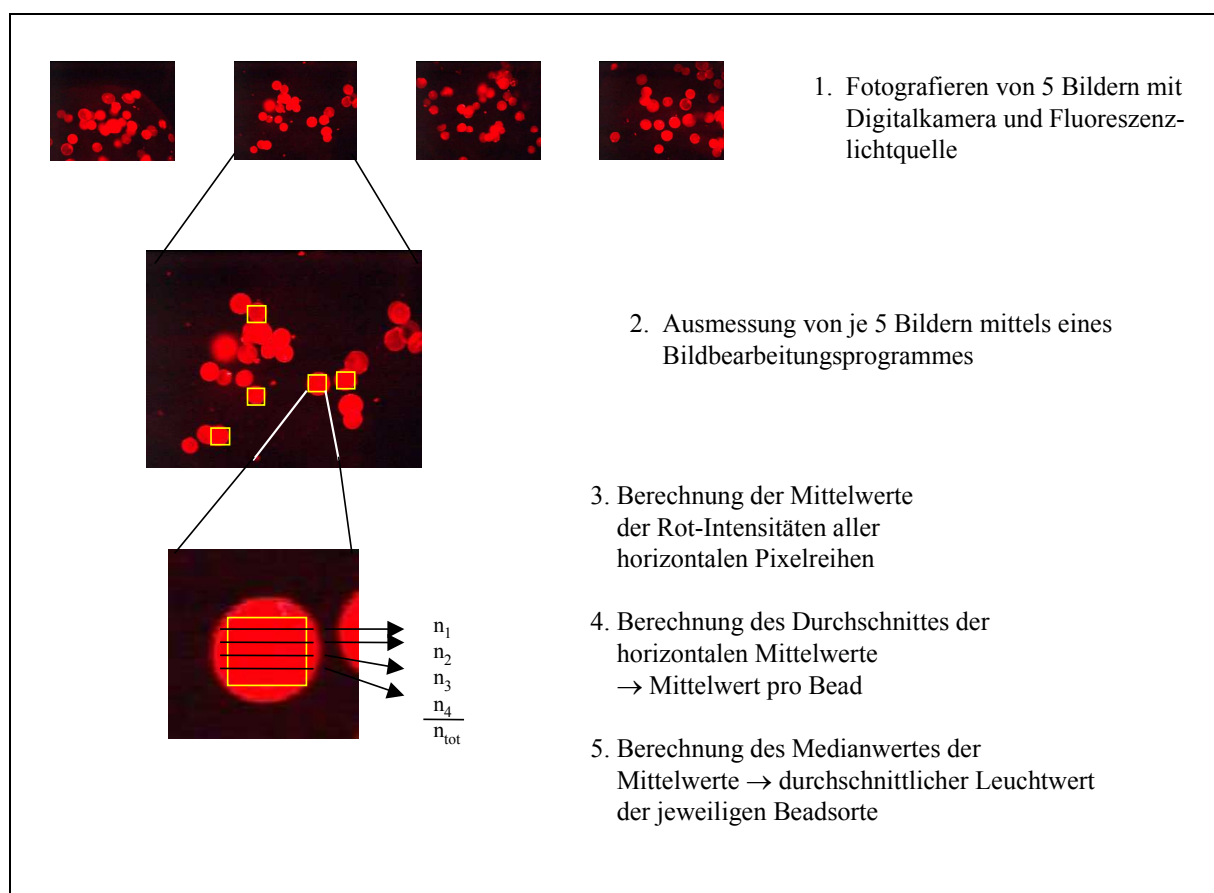
- Ungefähr 100 Beads mit der zu messenden Substanz werden gut mit PBS-Puffer gespült. Nicht wässrige Lösungsmittel verändern das Bindungsverhalten von Antikörpern an kleine Moleküle.
- Die Beads werden mit 100 μl an 0.1 μM mAB-Lösung in PBS-Puffer während 24 h inkubiert, um das System Bead/Verbindung - mAB ins Gleichgewicht zu bringen.
- Nach dem Entfernen (Abpipettieren) der überschüssigen mAB-Lösung wird ganz kurz 100 μl PBS-Puffer auf die Beads gegeben und sofort wieder abpipettiert, um mAB-Reste auf der Oberfläche der Beads zu entfernen.
- Zur Messung der Beads mit dem Fluoreszenzmikroskop werden die Beads auf eine Petrischale pipettiert und ein Tropfen Glycerin (ca. 200 μl) wird dazugegeben. Das Glycerin verhindert durch seine hohe Viskosität effizient das sofortige wegdiffundieren des Antikörpers aus dem Bead in die umgebende Lösung, was mit einer wässrigen Lösung der Fall ist, und verbessert somit das Signal/Untergrund-Verhältnis deutlich.
- Um eine gleichmässige Verteilung der Beads und einen gleichmässigen Abstand zur Detektionsebene der Kamera zu erreichen, wird noch eine kleinere Petrischale auf die Proben gelegt und der Glycerintropfen wird mit den Beads zu einem ca. ein mm dicken Film zusammengedrückt (**Figur 23**).



Figur 23. Beads eingebettet in Glycerin zwischen zwei Plastikpetrischalen

- Zur statistischen Auswertung der Beads wurden mit der CCD-Kamera am Fluoreszenzmikroskop je Beadsorte vier Bilder aufgenommen und von diesen Bildern je fünf Beads mittels einem Bildverarbeitungsprogramm ausgewertet. In die Beads wurde ein passendes Rechteck gelegt und die Leuchtintensitätswerte von jedem Pixel abgespeichert. Von den einzelnen Beads wurden dann die Mittelwerte der Rotwert-Leuchtintensitäten der horizontalen Pixel-Reihen berechnet. Von diesen wiederum wurde ein vertikaler Gesamtdurchschnitt berechnet, was den Mittelwert der Leuchtintensität pro Bead ergibt. Von

den 20 Beads wurde dann der Medianwert gebildet (nicht der Mittelwert)¹, was der gesamten durchschnittlichen Leuchtintensität der jeweiligen Beadsorte entspricht. Zudem wurde noch von jedem Bild die durchschnittliche Hintergrundintensität gemessen und von den jeweiligen Leuchtintensitäten subtrahiert, was die relative Leuchtstärke ergab (**Figur 24**). Dieser letzte Schritt verändert im allgemeinen nichts am Endresultat, es werden nur die Intensitätsunterschiede etwas besser hervorgehoben.



Figur 24. Ablauf der Ausmessung der Leuchtintensitäten der verschiedenen Beadsorten. Zuerst werden Fotos der Beads aufgenommen, von denen dann einige Beads ausgewertet werden. Um den Mittelwert pro Bead zu bekommen, werden die horizontalen Mittelwerte gebildet, der Medianwert dieser Mittelwerte ergibt dann die durchschnittliche Leuchtintensität einer Beadsorte.

Der in unserem Falle unerwünschte Effekt einer Diffusion von mAB aus den Beads darf nicht vernachlässigt werden. Beobachtungen bei der Arbeit mit den Beads haben ergeben, dass innert weniger Minuten ein grosser Teil des gebundenen Antikörpers in die umgebende Lösung hinausdiffundiert, wenn ein wässriger Puffer verwendet wird. Dieser Effekt wurde auch schon in einem Katalysatorassay benutzt, bei dem ein auf dem Bead entstandenes Produkt in eine polymere Matrix diffundierte und dort zu einer Fluoreszenzreaktion führte¹¹⁶.

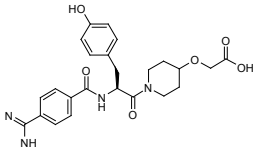
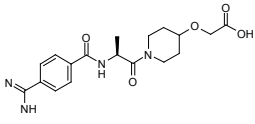
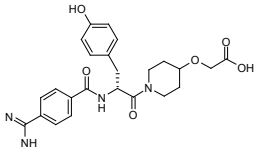
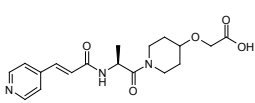
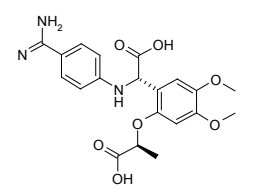
¹ Der Mittelwert eignet sich nur für grössere Datensätze, mit dem Medianwert werden einzelne Extremwerte in einem kleinen Datensatz besser eliminiert.

4. Überprüfung des Konzeptes anhand von vorhandenen Antagonisten aus dem Lamifiban/GPIIbIIIa-Projekt

Um den „on-bead“-Assay mit fluoreszenzmarkiertem mAB anhand einer praktischen Anwendung zu überprüfen und zu sehen, inwieweit er verlässliche Aussagen macht, wurden in einer ersten Testserie vier bekannte Roche-Verbindungen aus dem GPIIbIIIa/Lamifiban-Projekt auf ihr Verhalten in einem mAB-Test untersucht, zur Verbesserung der Statistik wurden in einer zweiten Serie noch einige weitere Verbindungen dazugenommen. Die verschiedenen Beadklassen wurden nach oben beschriebener Prozedur mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper inkubiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

4.1 Test von vier GPIIbIIIa-Rezeptor-Antagonisten mit dem mAB-Assay

In **Tabelle 7** sind die Strukturen der eingesetzten Verbindungen und deren Affinitätskonstanten gegenüber dem mAB und dem GPIIbIIIa-Rezeptor aufgeführt. Es wurden Verbindungen aus dem Lamifiban-Projekt ausgesucht, welche eine Carboxygruppe aufwiesen, über die sie durch eine einfache Amidbindung ans Harz gekoppelt werden konnten.

| Roche-Nummer | Struktur | IC ₅₀ uM (ADP) | k _{ass} (M ⁻¹ s ⁻¹) | k _{diss} (s ⁻¹) | K _A (M ⁻¹) | K _D (M) |
|-------------------|---|---------------------------|---|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| RO-44-9883 (Lam.) |  | 0.05 | 3.6 * 10 ⁶ | 9.4 * 10 ³ | 3.7 * 10 ⁸ | 2.7 * 10 ⁻⁹ |
| RO-44-3888 |  | 0.03 | 1.0 * 10 ⁷ | 1.7 * 10 ² | 5.6 * 10 ⁸ | 1.8 * 10 ⁻⁹ |
| RO-47-9528 |  | 0.855 | 2.7 * 10 ⁶ | 2.8 * 10 ² | 2.6 * 10 ⁷ | 3.8 * 10 ⁻⁸ |
| RO-62-6592 |  | 42.8 | 2.5 * 10 ⁴ | 6.1 * 10 ² | 2.9 * 10 ⁵ | 3.4 * 10 ⁻⁶ |
| RO-66-8581 |  | 2) | 1) | 1) | 2.4 * 10 ⁵ | 4.2 * 10 ⁻⁶ |

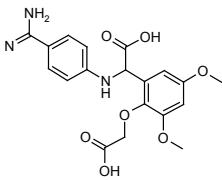
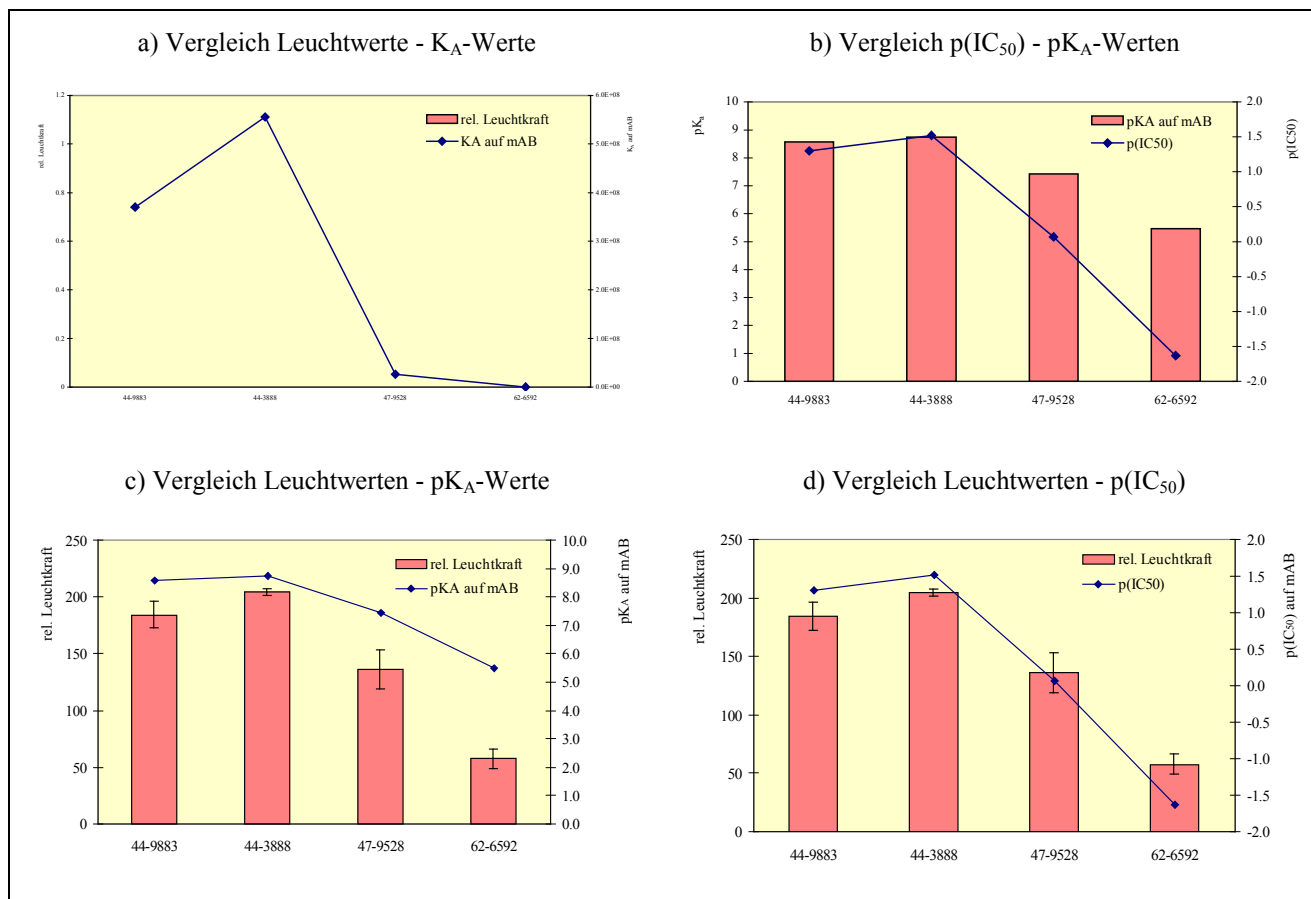
| | | | | | | |
|--|---|----|----|----|------------------|---------------------|
| RO-66-3108 |  | 2) | 1) | 1) | $2.3 \cdot 10^5$ | $4.3 \cdot 10^{-6}$ |
| 1) Konnten nicht bestimmt werden: Brechzahlunterschied zwischen Laufpuffer und Probe zu gross 2) Nicht bekannt, da es sich um FVIIa-Inhibitoren handelt | | | | | | |

Tabelle 7. Strukturen und Affinitätskonstanten der im ersten Versuch eingesetzten Verbindungen

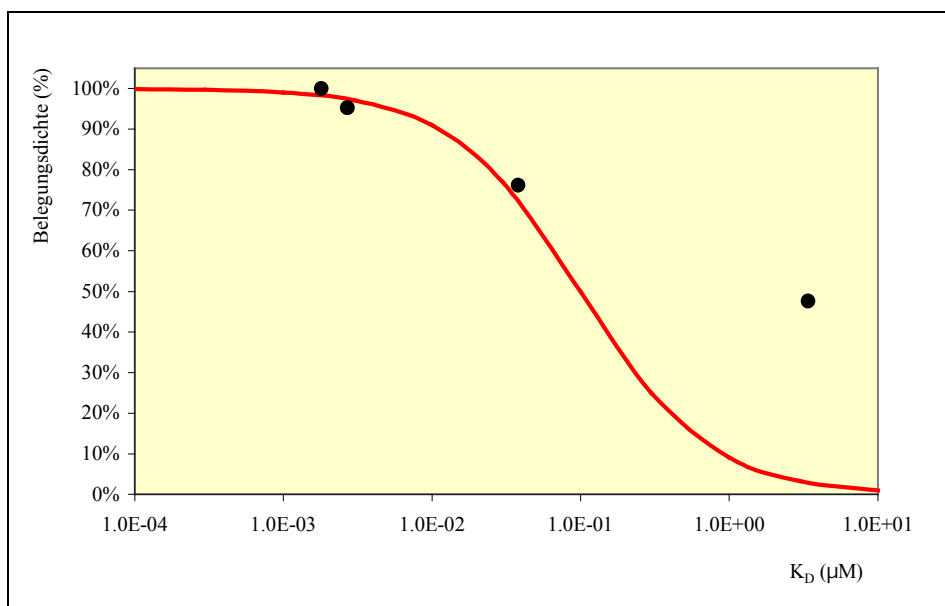
Die Resultate der gemessenen Leuchtstärken der Verbindungen aus **Tabelle 7** sind in **Figur 25** dargestellt und mit den K_a - und pK_a -Werten der Verbindungen gegen den mAB (BiaCore-Messungen) und den IC_{50} - und pIC_{50} -Werten (p = negativer Logarithmus) der Verbindungen gegen den Rezeptor verglichen.



Figur 25. Vergleiche der mittels Festphasenassay gemessenen Leuchtintensitäten mit den Affinitätswerten der Verbindungen am mAB (K_A -Werte) und am Rezeptor (IC_{50} -Werte). a) Leuchtintensitäten auf den Beads (orange), K_A -Werte am Antikörper (blau); b) $p(IC_{50})$ -Werte am Rezeptor (orange), pK_A -Werte am Antikörper (blau); c) Leuchtintensitäten auf den Beads (orange), pK_A -Werte am Antikörper (blau); d) Leuchtintensitäten auf den Beads (orange), $p(IC_{50})$ -Werte am Rezeptor (orange)

Der Vergleich der Leuchtwerte auf den Beads zeigt eine eindeutige Korrelation mit a) den Affinitäten der Substanzen zum mAB (K_A -Werte). Auch ein Vergleich b) zwischen den logarithmischen Werten der beiden Affinitätsarten, den pK_A -Werten und den $p(IC_{50})$ -Werten zeigt eine schöne Korrelation. Ein Vergleich c) und d) dieser logarithmischen Werte mit den Leuchtintensitäten zeigt auch hier eine gute Korrelation, obwohl es keinen mathematisch einsichtigen Zusammenhang dafür gibt.

Werden die Leuchtwerte mit der theoretisch entsprechenden Langmuir-Isotherme verglichen, ergibt sich das in **Figur 26** dargestellte Bild. Hierbei ist die Leuchtintensität des höchstaffinen getesteten Liganden gleich 100 % Belegungsichte gesetzt worden.

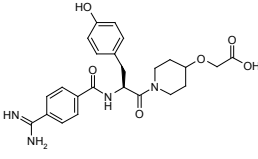
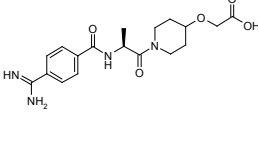
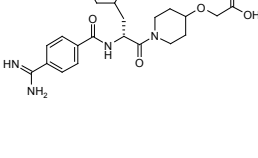
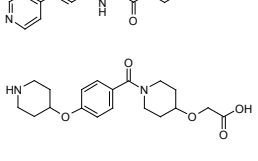
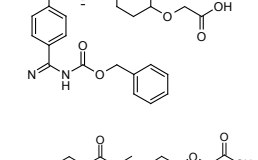
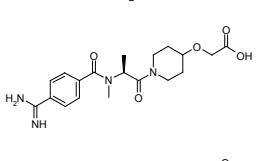
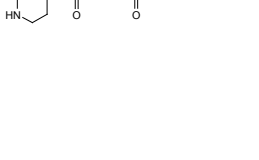



Figur 26. Vergleich der Leuchtintensitäten (\cong Oberflächenbeladungen) der vier gemessenen Verbindungen mit der entsprechenden Langmuir-Isotherme bei einer Ligandkonzentration von $c_{\text{mAB}} = 0.1 \text{ mM}$

Wie man sieht, stimmen die Leuchtintensitäten des „on-bead“-Assays mit der theoretisch zu erwartenden Antwort nur tendenziell überein. Die Abweichungen rühren einerseits daher, dass der verwendete Ansatz ein Multikomponentensystem mit sehr vielen Einflussfaktoren darstellt, z.B. kann die Oberfläche der Beads als keineswegs ideal bezeichnet werden, noch ist die eingesetzte mAB-Konzentration in hohem Überschuss vorhanden, v.a. bei den aktiveren Verbindungen tritt wohl eine Verarmung an mAB ein, und es werden gar nicht alle für die mAB verfügbaren Stellen besetzt. Zudem ist auf den Beads immer eine erhebliche Streulichtintensität registrierbar. All diese Faktoren führen zu einer Abflachung der Kurve, wie es hier der Fall ist. Auch treten wahrscheinlich interne Quenching-Effekte oder Eigenabsorptionen auf, die die Leuchtwerte verfälschen.

4.2 Test von sechs weiteren GPIIbIIIa-Rezeptor-Antagonisten

Da die Resultate von nur vier Testverbindungen nicht statistisch relevant sind, wurde dasselbe Experiment noch mit sechs weiteren Verbindungen aus dem gleichen Projekt durchgeführt. Die getesteten Substanzen inklusive die Substanzen aus der ersten Serie sind in **Tabelle 8** dargestellt. Die Resultate aus dem Screeningassay mit dem monoklonalen Antikörper sind in **Figur 27** aufgeführt.

| Roche-Nummer | Struktur | IC ₅₀ uM (ADP) | K _A (M ⁻¹) | K _D (M) |
|------------------|---|---------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| Ro-44-9883 (Lam) |  | 0.05 | 3.7 * 10 ⁸ | 2.7 * 10 ⁻⁹ |
| Ro-44-3888 (Sib) |  | 0.03 | 5.6 * 10 ⁸ | 1.8 * 10 ⁻⁹ |
| Ro-47-9528/000 |  | 0.855 | 2.6 * 10 ⁷ | 3.8 * 10 ⁻⁸ |
| Ro-62-6592/000 |  | 42.8 | 2.9 * 10 ⁵ | 3.4 * 10 ⁻⁶ |
| Ro-61-3490/000 |  | >100 | 4.0 * 10 ³ | 2.5 * 10 ⁻⁴ |
| Ro-61-8202/000 |  | 2.734 | 2.2 * 10 ⁶ | 4.5 * 10 ⁻⁹ |
| Ro-47-6017/001 |  | 15.119 | 4.0 * 10 ⁴ | 2.5 * 10 ⁻⁵ |
| Ro-61-4373/000 |  | 0.041 | 1.8 * 10 ⁶ | 5.6 * 10 ⁻⁷ |
| Ro-61-5663/000 | | >193.9 | keine spezifische Bindung | |

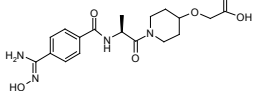
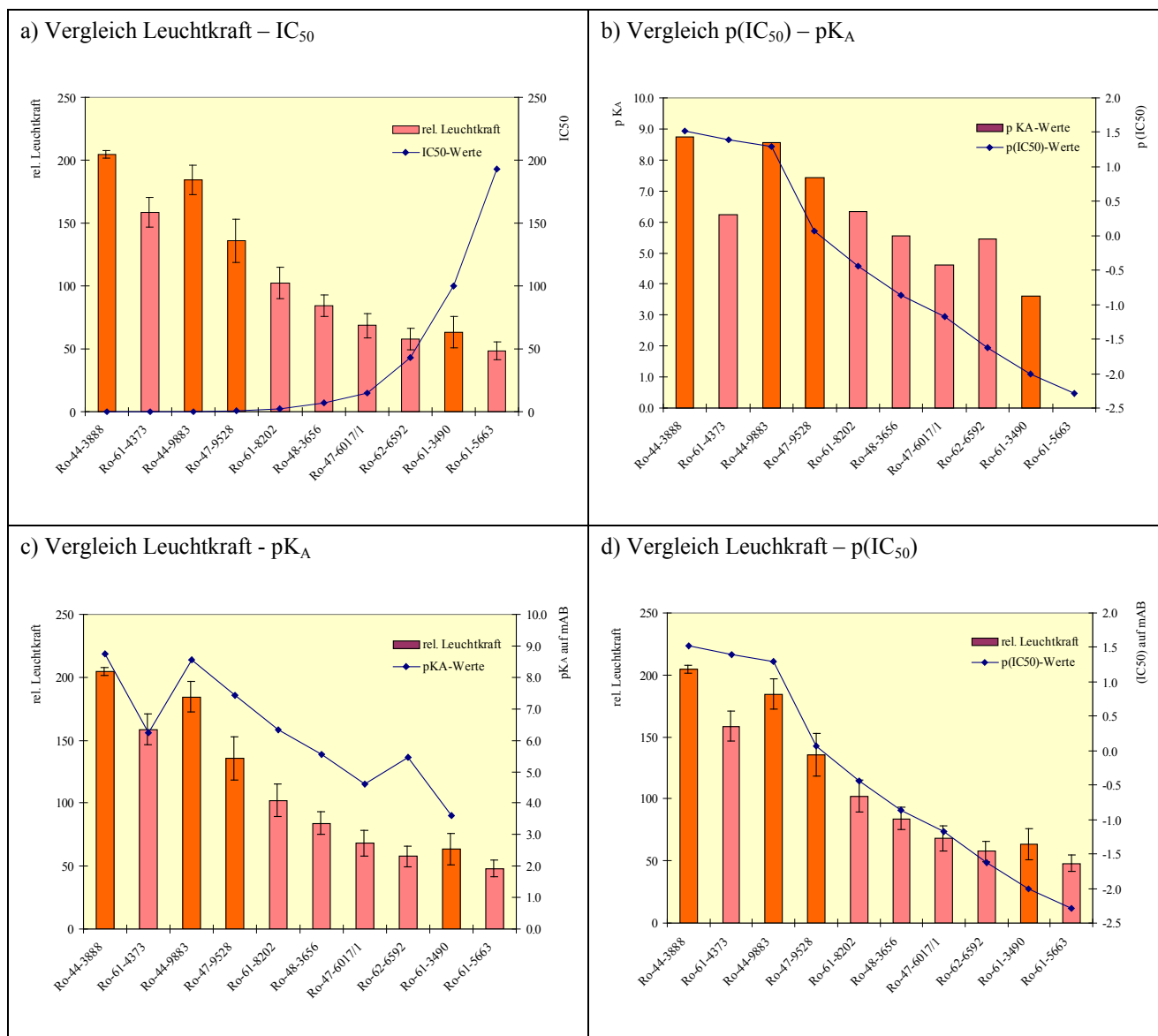
| | | | | |
|----------------|---|-----|------------------|---------------------|
| Ro-48-3656/000 |  | 7.3 | $3.5 \cdot 10^5$ | $2.8 \cdot 10^{-6}$ |
|----------------|---|-----|------------------|---------------------|

Tabelle 8. Die Verbindungen und deren Affinitätswerte, die in der zweiten Serie getestet wurden.

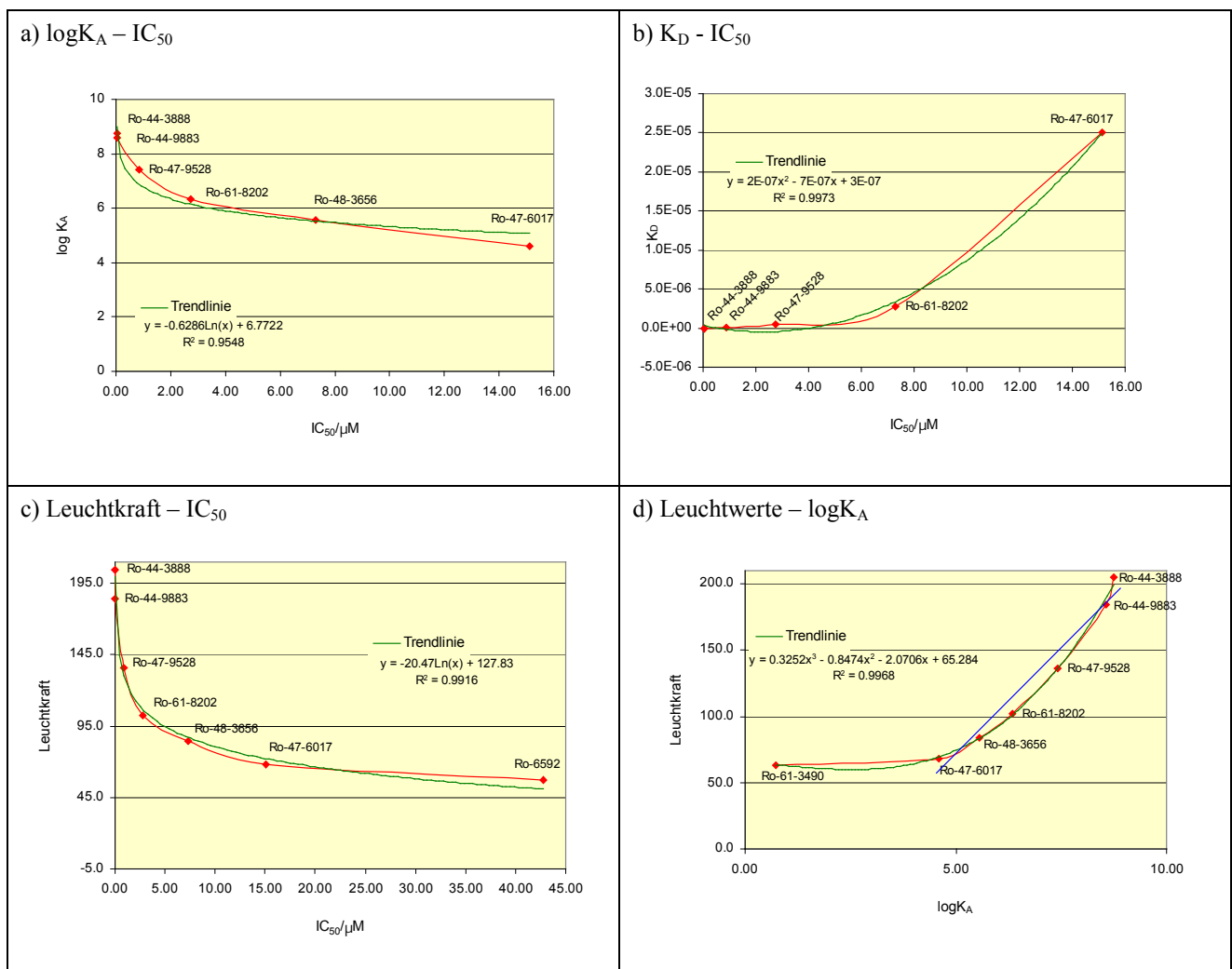


Figur 27. Verschiedene Vergleiche der Leuchtintensitäten mit den verschiedenen Affinitätswerten der Verbindungen am mAB und am Rezeptor. Die rosafarbenen Balken stellen die Proben aus der zweiten Testserie dar, die orangen Balken diejenigen aus der ersten Serie. a) Leuchtintensitäten auf den Beads (rot), IC₅₀-Werte am Rezeptor (blau); b) p(IC₅₀)-Werte am Rezeptor (rot), pK_A-Werte am Antikörper (blau); c) Leuchtintensitäten auf den Beads (rot), pK_A-Werte am Antikörper (blau); d) Leuchtintensitäten auf den Beads (rot), p(IC₅₀)-Werte am Rezeptor (blau)

Aus den Graphiken erkennt man wiederum, dass es eine starke Korrelation gibt zwischen den Leuchtintensitäten, die vom „on-bead“ Assay mit monoklonalem Antikörper herrühren und den a) IC₅₀-Werten (Assay am Rezeptor). Auch ein Vergleich c) und d) der Leuchtintensitäten mit den

logarithmischen Werten der Affinitätswerte und b) den logarithmischen Werten zeigt mit kleinen Unregelmässigkeiten jedesmal dieselbe gute Korrelation (vgl. **Figur 25**). Diese Unregelmässigkeiten bei den Leuchtintensitäten rühren wahrscheinlich daher, dass die Verbindungen in zwei Serien unter nicht genau identischen Bedingungen ans Harz gekoppelt wurden, was zu einer Abweichung in der Beladung des Harzes und folglich zu Auswirkungen in der Intensität der beobachteten Fluoreszenz führt.

Eine andere Methode die Tendenzen oder Abhängigkeiten der verschiedenen Affinitätswerte zu vergleichen, besteht darin, die entsprechenden Werte gegeneinander aufzutragen (**Figur 27**).



Figur 28. Durch Auftragen der verschiedenen Affinitätswerte gegeneinander erkennt man gewisse Abhängigkeiten. Neben den Kurven, die aus den Werten der getesteten Verbindungen entstehen (rot) sind noch Trendlinien mit der passenden Funktion (grün) dargestellt.

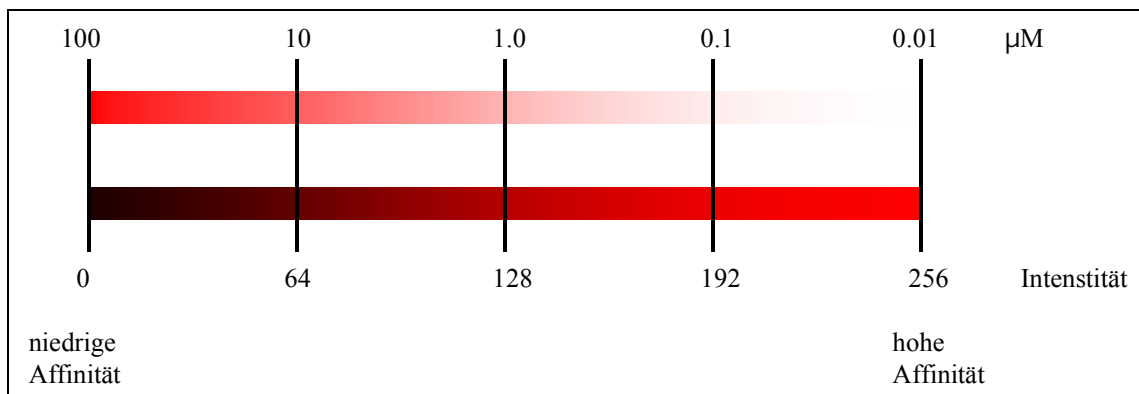
In den Graphiken a) und b) sind die beiden quantitativ gemessenen Affinitätskonstanten, K_D bzw. $\log K_A$ vom mAB gegen den IC_{50} -Wert vom Rezeptor aufgetragen. Im Idealfall würde man bei b) eine Gerade erwarten, was jedoch durch die gemessenen Werte nicht bestätigt wird. In den Graphiken c) und d) sind die Leuchtintensitäten einiger Verbindungen auf den Beads gegen die

IC₅₀-Werte bzw. die logK_A-Werte aufgetragen. Man erkennt auch hier eine nicht-lineare Abhängigkeit, wobei bei höheren logK_A-Werten in Graphik d) eine fast lineare Abhängigkeit zu beobachten ist (blaue Linie). Bei niedrigeren logK_A-Werten sind die Leuchtintensitäten des Untergrundes zu gross und die Kurve flacht ab. Auch in Graphik c) erkennt man, dass die Kurve bei höheren IC₅₀-Werten (schwächere Bindungen) abflacht, weil die Leuchtintensitäten weniger stark abnehmen als bei niedrigeren IC₅₀-Werten.

4.3 Die Skala der Lichtintensitätsmessung

Mit diesen Beobachtungen wurde ein erster Hinweis erbracht, dass monoklonale Antikörper als Rezeptorersatz verwendet werden können. Die Abstufungen der IC₅₀-Werte der Verbindungen gegenüber dem Rezeptor, die sich von 0.05 µM bis > 100 µM bewegen können auch in einem „on-bead“-Assay beobachtet werden.

Jedoch sind die Differenzierungen aufgrund einer statistischen Analyse von einigen fotografierten Beads nicht so eindeutig, da die Standardabweichung bei den Leuchtintensitätswerten bei ± 10 % liegt. Zudem beschränkt sich die Bandbreite der Lichtintensitäten auf die Werte 0 – 256, wobei die unspezifische Untergrundstrahlung schon meistens 30 – 40 Einheiten ausmacht. Wo sich also die Affinitäten auf dem Rezeptor über fast vier Zehnerpotenzen erstrecken, sind die entsprechenden Leuchtwerte auf den Beads in nur 200 Einheiten komprimiert (**Figur 29**).



Figur 29. Gegenüberstellung der Skalen für die IC₅₀-Werte des Rezeptortests und die Intensitätswerte aus dem „on-bead“-Assay.

4.4 Fehlerquellen beim Antikörper-Assay

Es ist anzufügen, dass dieser Nachweis für einen erfolgreichen Ersatz des Rezeptors durch einen Antikörper mit einem quasi „idealisierten“ System durchgeführt wurde. Die Synthese beschränkte sich auf eine Amidkopplung der Substanz aufs PEGA-Harz. Es ist stark anzunehmen, dass diese bei allen Substanzen annähernd quantitativ oder zumindest in etwa gleich grossem Ausmass abläuft,

was zu einer gleich grossen Beladung für alle Substanzen führt. Es sind also keine Edukte oder Nebenprodukte auf dem Harz zu erwarten, welche bei einem Screening zu verfälschten Leuchtintensitäten führen können.

Ein weiterer wichtiger Punkt, den es zu beachten gilt, ist die Inkubationszeit mit dem Antikörper. Wie man in **Tabelle 6** sieht, ist die maximale Besetzungsdichte der Bead-Oberfläche mit Antikörper erst nach 24 h erreicht. Um diesen Gleichgewichtszustand zu erhalten, ist es wichtig, dass man die Beads nach der Inkubation *nicht* einem Waschschrift unterzieht, weil es dabei durch die unterschiedlichen Desorptionskonstanten (k_d) wieder zu einer Verfälschung der gemessenen Leuchtintensitäten kommt. Dies haben erste Versuche gezeigt, bei denen weder eine ausreichend lange Inkubationszeit noch ein genaues Waschprotokoll eingehalten wurde. Um bei der Messung diesen Effekt zu verhindern, wird Glycerin als Matrix verwendet, welches die Diffusion von Antikörper verhindert, die Beads sozusagen konserviert und so zu einem besseren Signal/Rausch-Verhältnis der Lichtintensitäten führt.

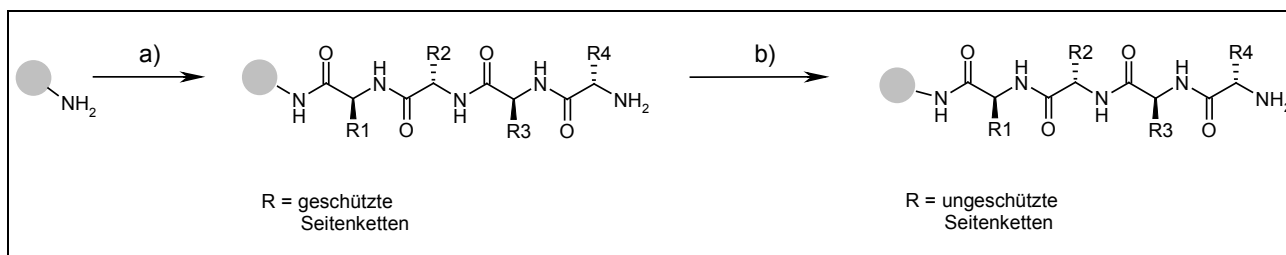
5. Überprüfung des Konzeptes mittels Tetrapeptidbibliotheken auf Festphase

Um die Hypothese, dass monoklonale Antikörper als Rezeptorersatz wirken können, auch in einem praktischen Ansatz zu überprüfen, wurden parallel zu den BiaCore-Untersuchungen, Tetrapeptidbibliotheken auf PEGA-Beads synthetisiert und danach mit fluoreszenzmarkiertem mAB untersucht. Die aktivsten Beads aus dem Antikörpertest wurden dann isoliert und die Sequenzen der harzgebundenen Peptide wurden mittels Edman-Abbau analysiert. Diese Peptidsequenzen wurden dann in etwas grösserem Massstab auf Festphase synthetisiert, um die Aktivitäten gegenüber dem Rezeptor im Rezeptorassay und diejenigen gegenüber dem mAB auf dem BiaCore-Gerät quantitativ messen zu können.

5.1 Synthese der Tetrapeptidbibliothek

Die Synthesesequenz ist in **Schema 5** dargestellt. Zuerst wurde ein Photolinker gefolgt von einem Glycin ans Harz gekoppelt. Das Glycin dient als Spacer, zur besseren Zugänglichkeit des mAB an das auf den Linker folgende Tetrapeptid. Um sicherzugehen, dass keine unspezifischen Wechselwirkungen die Leuchtintensitäten der Messungen beeinträchtigen, wurden in einem Vorversuch das unsubstituierte PEGA-Harz, das mit Photolinker modifizierte Harz und das Harz mit Photolinker und Glycin modifizierte Harz mit fluoreszenzmarkiertem mAB inkubiert und untersucht, wobei weder deutliche Leuchtintensitäten noch irgendwelche falsch-positiven Beads detektiert werden konnten.

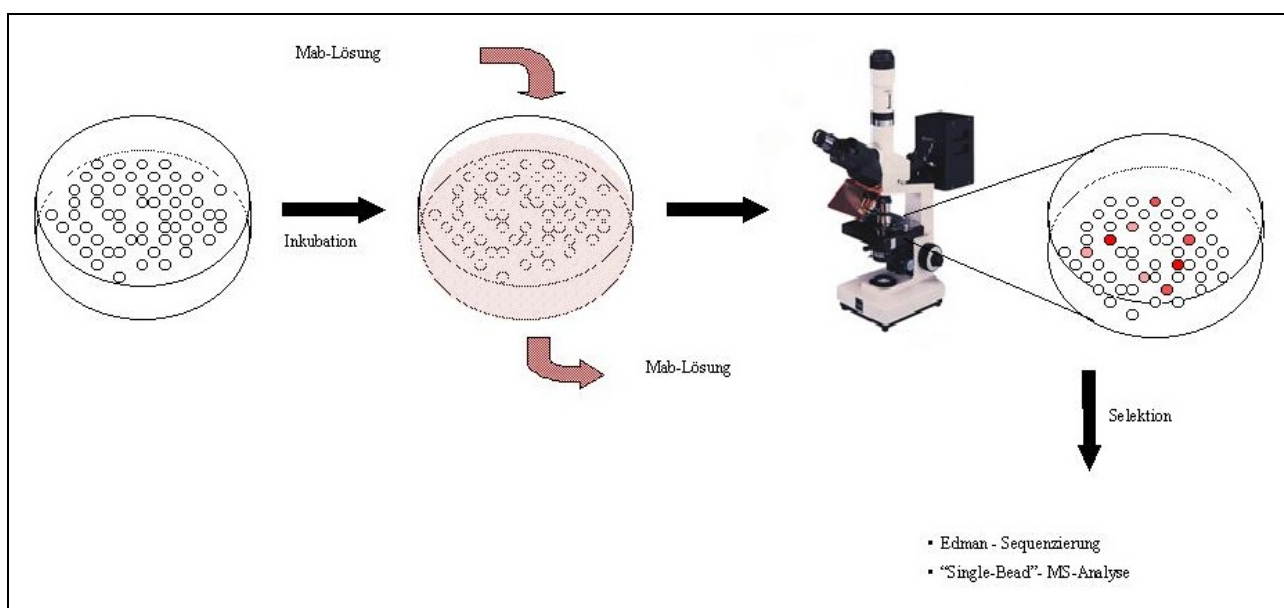
Die gesamte Tetrapeptid-Synthesesequenz wurde mittels der Fmoc-Methode durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass statistisch betrachtet von jeder Verbindung mindestens ein Exemplar hergestellt wird, wurde ein fünffacher Überschuss an Harz eingesetzt. Die mögliche Anzahl Tetrapeptide beträgt $20^4 = 160'000$, wobei ca. 800'000 Harzbeads eingesetzt wurden.



Schema 5. Synthesesequenz der Tetrapeptidbibliothek an PEGA-Harz. a) i: 1 equ. Harz, 5 equ. HATU, 10 equ. DIPEA, 5 equ. Fmoc-Glycin oder andere Aminosäure, 2 h, RT, ii: 20 % Piperidin, RT, 20 Min., b) TFA/H₂O/TIPS 95/3/2, 1 h, RT. Schritt a) wird für die jeweils eingesetzte Aminosäure wiederholt.

5.2 Selektion mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem mAB

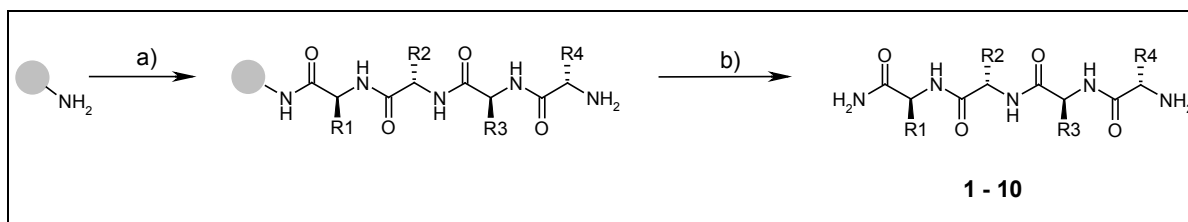
Das Screening und die Selektion der aktiven Beads geschah bei den Tetrapeptidbibliotheken noch nicht unter den optimierten Bedingungen wie sie in **Kapitel 5** beschrieben sind. Die Beads wurden ca. 2 h mit 0.1 μM mAB-Lösung inkubiert, danach wurden alle Beads fünf Minuten mit PBS-Puffer gewaschen, um die überschüssige an den Beads haftende Antikörperlösung zu entfernen. Die Beads wurden in PBS-Puffer auf eine Petrischale gegeben und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die am stärksten leuchtenden Beads wurden in einzelne Öffnungen einer „96 well-plate“ überführt (**Figur 30**). Zudem wurden ca. 50 mittelgut leuchtende Beads zusammen in eine Öffnung gegeben, um ein multiples Screening durchzuführen.



Figur 30. Screening-Prozedur einer Bibliothek von „One Bead - One Compound“- Bibliotheken.

5.3 Identifikation und Synthese von Peptidsequenzen

Mittels Edman-Abbau wurden zehn der am stärksten leuchtenden Beads sequenziert. Die identifizierten Peptide aus **Tabelle 9** wurden danach gemäss dem Fmoc-Peptidsyntheseprotokoll auf Tentagel mit einem Rink-Amid-Linker hergestellt (**Schema 6**).



Schema 6. Synthesepfad der identifizierten Tetrapeptide auf Tentagel mit Rink-Amid-Linker: a) i: 1 equ. Harz, 5 equ. HATU, 10 equ. DIPEA, 5 equ. Fmoc-Glycin oder andere Aminosäure, 2 h, RT, ii: 20 % Piperidin, RT, 20 Min., b) TFA/H₂O/TIPS 95/3/2, 1 h, RT. Schritt a) wird für die jeweils eingesetzte Aminosäure wiederholt.

Die Aminosäuresequenzen, die bei der Edman-Analyse der Peptide auf den selektierten Harzbeads bestimmt wurden und in 10-Milligramm-Massstab nachsynthetisiert worden sind, sind in **Tabelle 9** aufgeführt.

| Sequenz | N-Terminus | | | | C-Terminus |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------|
| | R ₄ | R ₃ | R ₂ | R ₁ | |
| 1 | Phe | Arg | Arg | Arg | Gly |
| 2 | Lys | Arg | Phe | Arg | Gly |
| 3 | Tyr | Met | Glu | Ala | Gly |
| 4 | Arg | Tyr | Glu | His | Gly |
| 5 | Tyr | Arg | Leu | Met | Gly |
| 6 | Pro | Arg | Asn | Arg | Gly |
| 7 - 10 | His | Glu/Ile | Phe/Ile | Phe | Gly |
| 7 | His | Glu | Phe | Phe | Gly |
| 8 | His | Glu | Ile | Phe | Gly |
| 9 | His | Ile | Phe | Phe | Gly |
| 10 | His | Ile | Ile | Phe | Gly |

Tabelle 9. Die aktivsten Peptide aus dem Edman-Abbau

Bei der siebten Sequenz konnten die beiden mittleren Aminosäuren des Tetrapeptids nicht genau bestimmt werden, sodass alle möglichen Kombinationen dieser Aminosäuresequenzen für eine genauere Analyse ausgewählt wurden.

Nach der Synthese dieser ersten Tetrapeptidbibliothek wurde noch eine zweite Bibliothek in gleicher Weise synthetisiert, wobei diese Beads dann nicht nur fünf Minuten, sondern mehrere Stunden wieder gewaschen (entfärbt) wurden. Auch diese Beads wurden mittels Edman-Abbau analysiert. Die Resultate dieser Analyse sind hier nicht aufgeführt, da die lange Waschzeit zu einer

Verfälschung der Resultate geführt hat. Es wurden nur Beads mit Aminosäuresequenzen, die mehr als zwei Arginine enthielten, selektiert und identifiziert. Es wurde sogar das Peptid Arg-Arg-Arg-Arg-Gly gefunden. Diese Argininhaltigen Peptide wechselwirken nicht mehr spezifisch mit der Erkennungssequenz des Antikörpers, sondern unspezifisch mit den Säurefunktionen der Asp- und Glu-Seitenketten am mAB.

Dieses Resultat deutet daraufhin, dass die Desorptionskonstanten (k_d , off-rates) für Peptide, die basische Guanidingruppen enthalten, viel kleiner sind als dieselben Werte für andere Peptide und bestätigt wiederum, dass dem Gleichgewichtszustand/der Sättigung auf dem Bead, sowie einem Waschschrift eine essentielle Bedeutung zukommt.

5.4 Test der 10 Peptide gegen den GPIIbIIIa Rezeptor

Die zehn Verbindungen wurden in einem ELISA-Assay gegen den natürlichen GPIIbIIIa-Rezeptor getestet. In **Tabelle 10** sind die Verhältnisse der IC_{50} -Werte der Peptide im Verhältnis zum natürlichen Substrat RGDS, sowie die IC_{50} -Werte dargestellt.

| Verbindung | Sequenz | IC_{50} Peptid : IC_{50} (RGDS) | IC_{50} |
|-------------|---------|-------------------------------------|-------------|
| Lamifiban | | - | 1 nM |
| RGDS | | - | 3.7 μ M |
| 1 | FRRRG | > 1141 | > 4.2 mM |
| 2 | KRFRG | > 1141 | > 4.2 mM |
| 3 | TMEAG | > 1141 | > 4.2 mM |
| 4 | RTEHG | > 1141 | > 4.2 mM |
| 5 | TRLMG | > 1141 | > 4.2 mM |
| 6 | PRNRG | 880 | 3.2 mM |
| 7 | HEFFG | > 1141 | > 4.2 mM |
| 8 | HEIFG | 1066 | 3.9 mM |
| 9 | HIFFG | 720 | 2.6 mM |
| 10 | HIIFG | 756 | 2.8 mM |

Tabelle 10. Resultate des Bindungsassays auf dem GPIIbIIIa-Rezeptor. Es sind einerseits Lamifiban und das natürliche Substrat RGDS aufgeführt, andererseits die ausgesuchten und nachsynthetisierten Tetrapeptide aus der Split & Mix-Bibliothek.

Die Verbindungen zeigen nur eine sehr geringe Aktivität, im unteren mM Bereich. Die Besten binden ungefähr 10^3 mal schlechter als Lamifiban. Einige der Substanzen sind gar nicht mehr, die

Aktiveren sind nur noch knapp messbar. Die Strukturen dieser Peptide sind in **Tabelle 11** dargestellt.

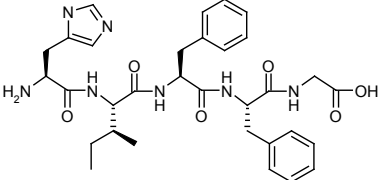
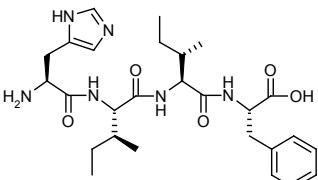
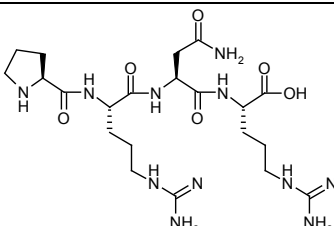
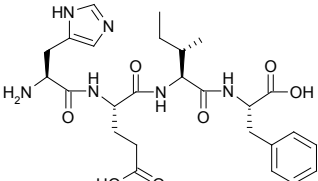
| Peptid | Struktur | IC ₅₀ |
|-----------|---|------------------|
| 9 |  | 2.6 mM |
| 10 |  | 2.8 mM |
| 6 |  | 3.2 mM |
| 8 |  | 3.9 mM |

Tabelle 11. Strukturen der vier aktivsten noch messbaren Tetrapeptide

Bei der Betrachtung dieser Strukturen fällt auf, dass drei dieser Substanzen aus der Variation der Sequenz **7-10** in **Tabelle 9** stammen. Bemerkenswert ist, dass diese Substanzen N-terminal ein basisches Histidin besitzen und in der Mitte und C-terminal hydrophobe Seitenketten wie Isoleucin und Phenylalanin aufweisen. Im Gegensatz dazu besitzt die Struktur **6** gleich zwei basische Seitenketten von Arginin-Bausteinen und eine polare Seitenkette des Asparagin-Bausteins. Falls die beiden Substanzklassen beide an derselben Stelle des mAB binden, ist fest anzunehmen, dass ein anderer Bindungsmodus wirkt.

5.5 Test der 10 Peptide gegen den mAB mittels BiaCore-Messung

Mittels Messungen auf einem BiaCore-Gerät wurden die tatsächlichen Affinitäten der identifizierten Peptide gegenüber dem anti-Lamifiban-mAB LMF-2 untersucht. Die Affinitäten gegen den Antikörper wurden bisher erst anhand der Messungen bzw. aus dem Vergleich der relativen Fluoreszenz-Leuchtstärken der Verbindungen auf den Beads qualitativ untersucht. Mit den BiaCore-Messungen wurde eine Quantifizierung sowie eine Validierung der Methode erhofft. Leider zeigen die Peptide jedoch keine grosse Affinität gegenüber dem mAB. Dieses Resultat war nach den Resultaten des Bindungsassays aber zu erwarten. Wegen zu niedrigen Affinitäten konnten keine K_D -Werte bestimmt werden, es konnte aber trotzdem eine Affinitätsreihenfolge (**Tabelle 12**) für die Peptide erstellt werden.

| Verbindung | Sequenz | Affinität |
|------------|-----------------------------|--|
| 10 | His – Ile – Ile – Phe – Gly | Hohe Affinität |
| 7 | His – Glu – Phe – Phe – Gly | |
| 3 | Tyr – Met – Glu – Ala – Gly | Mittlere Affinität |
| 9 | His – Ile – Phe – Phe – Gly | Niedrige Affinität |
| 8 | His – Glu – Ile – Phe – Gly | |
| 4 | Arg – Tyr – Glu – His – Gly | |
| 2 | Lys – Arg – Phe – Arg – Gly | |
| 1 | Phe – Arg – Arg – Arg – Gly | |
| 5 | Tyr – Arg – Leu – Met – Gly | |
| 6 | Pro – Arg – Asn – Arg – Gly | Keine Affinität mit 100 μ M Lösung |
| RGDS | Arg – Gly – Asp – Ser | |

Tabelle 12. Affinitätsreihe gegenüber dem mAB LMF-2, gemessen mittels BiaCore. Die Affinitäten sind von oben nach unten abnehmend, innerhalb der umrandeten Gruppen sind sie ungefähr gleich gross.

Es ist interessant, dass sogar mit dem nicht optimierten Bindungsassay überhaupt Peptide gefunden wurden, die einerseits am mAB und andererseits am Rezeptor binden. Dies steht im Widerspruch zu der Beobachtung, dass das natürliche peptidische Substrat RGDS zwar sehr gut am Rezeptor bindet ($IC_{50} = 3.7 \mu M$), jedoch gegenüber dem mAB keinerlei Aktivität zeigt. Daher ist es fraglich, ob mit Peptiden aus dem mAB-Assay überhaupt eine höhere Aktivität erreicht werden kann, da der Bindungsmodus wie es scheint nicht bei allen Verbindungen und Verbindungsklassen identisch ist.

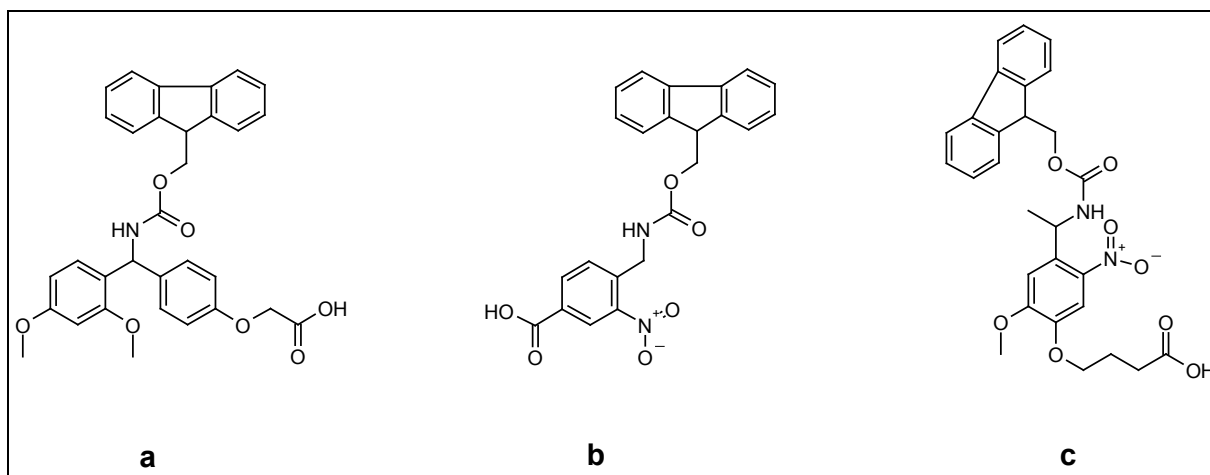
6. Entwicklung eines neuartigen Linkers für die Festphasensynthese und die massenspektrometrische Analyse von Peptiden auf einzelnen Beads

6.1 Einleitung

Die generellen Anforderungen für Linker, die in der SPPS („Solid Phase Peptide Synthesis“) und SPOC („Solid Phase Organic Chemistry“) Anwendung finden, sind:

- Einfache und quantitative Kopplung ans Harz.
- Einfache und quantitative Synthese am Linker.
- Chemische Stabilität während der Synthesesequenz (Orthogonalität) und keine Nebenreaktionen mit funktionellen Gruppen des Linkers.
- Quantitative und selektive Abspaltung des Produktes.
- Spaltreagenzien und -bedingungen müssen kompatibel mit den nachfolgenden Bedingungen sein.
- Je nach Anwendung sind „traceless“-Linker von Vorteil.

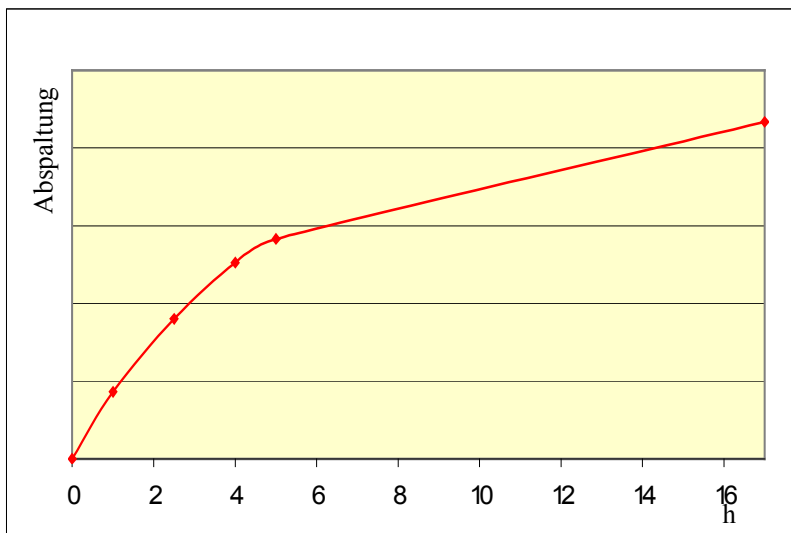
Im Rahmen der laufenden Arbeit und im Hinblick auf eine Analyse von einzelnen aktiven identifizierten Beads nach einem Screening-Schritt, wurden verschiedene Linkersysteme für die Synthese von kurzen Polypeptiden und die darauffolgende „Single-Bead“-Analyse mit Ionenspray-MS-MS und MALDI-TOF-MS untersucht. Die Synthese am in der Peptidchemie sehr verbreiteten Rink-Linker (**Figur 31, a**) sowie die nachfolgende Abspaltung vom Harz ist problemlos, jedoch wurde diese Möglichkeit nach einigen Synthesen und erfolglosen Versuchen zur Analyse für die „Single-Bead“-Analyse nicht mehr in Betracht gezogen, weil die für die Abspaltung der Schutzgruppen benötigte Behandlung mit TFA gleichzeitig auch das Peptid vom Harz spaltet und dies zu Verunreinigungen in der Abspalllösung führt. Probleme mit säuresensitiven Linkern sind Nebenreaktionen, ausgelöst durch die TFA-Behandlung, wie Oxidation oder Alkylierung von Methionin, Alkylierung von Tyrosin und Modifizierung von Tryptophan durch den Linker, Seitenkettenschutzgruppen oder den „Scavengern“ selbst oder aber die teilweise Zerstörung von empfindlichen Strukturen in Peptiden¹¹⁷. Der Einsatz von Scavengern unterdrückt diese Effekte, führt aber zu einer zusätzlichen Kontamination der Spalllösung und des Endproduktes. Zudem ist TFA in der Lösung für massenspektrometrische Untersuchungen ungeeignet¹¹⁸. In der ursprünglichen Problemstellung war vorgesehen, die ungeschützten Substanzen möglichst direkt „on-bead“ zu untersuchen. „Single-Bead“-Analysen mittels Massenspektrometrie wurden sogar schon ohne vorherige Abspaltung des Produktes vom Harz erfolgreich durchgeführt¹¹⁹, wobei die Laserenergie des MALDI-MS eine Spaltung des Produktes vom Harz und die Ionisierung in der Gasphase bewirkt. Einige Versuche unsererseits, Peptide ohne vorherige Spaltung vom Harz zu analysieren, blieben aber erfolglos.



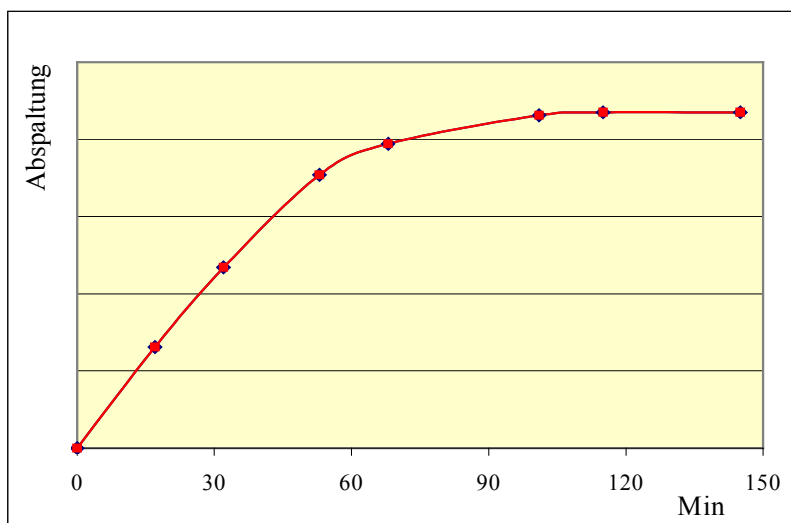
Figur 31. a) Fmoc-geschützter Rink-Linker, b) Fmoc-geschützter Photolinker, c) Fmoc-geschützter Photolinker RT1095

Als hoffnungsvolle Alternative bot sich eine relativ neue Methode der Linker-Technologie an, photolabile Linker mit o-Nitrobenzyl-Gerüst ^{120, 121, 122, 123}, mit welchen schon erfolgreiche „Single-Bead“-Analysen durchgeführt wurden ¹²⁴. Hiervon wurde ein in der Roche vorhandener Linker (**Figur 31, b**) sehr ausgiebig getestet. Die Schwachpunkte sind einerseits die niedrige Beladungsdichte am Harz, die trotz verschiedenen Kopplungsvarianten erreicht wurde und andererseits die lange Bestrahlungszeit von mehreren Stunden (**Graphik 1**), die nötig ist um die synthetisierten Verbindungen abzuspalten. Des weiteren sind die Reinheiten nach der photolytischen Abspaltung nicht befriedigend. Zudem erwies sich der Photolinker als nicht sehr stabil. Sogar vor Licht geschützt und gekühlt aufbewahrt, verliert das Harz an Beladungskapazität. Ein neuerer kommerziell erhältlicher o-Nitrobenzyl-Linker von Advanced Chemtech (**Figur 31, c**) wurde auch getestet. Dieser spaltet ohne beobachtbare Nebenreaktionen, die Beladung des Harzes ist höher und die Bestrahlungsdauer zur Abspaltung ist merklich kürzer (**Graphik 2**). Jedoch nimmt auch bei diesem Harz die Beladung mit der Zeit ab, auch wenn das Harz mit dem Linker unter Lichtausschluss und tiefgeköhlt aufbewahrt wird.

Die Kinetikmessungen der Abspaltung eines Produktes mittels Photolinker vom Harz wurde durch Bestrahlung eines Harzaliquotes mit einem modifizierten Dipeptid $\text{NH}_2\text{-(Dabsyl)Lys(Boc)-Gly-OH}$ darauf (**Figur 34**), durchgeführt. Dessen Absorption bei 466 nm ($\epsilon = 33'000$) wurde UV-spektrophotometrisch und mittels HPLC zeitlich verfolgt.



Graphik 1. Kinetikmessung der Abspaltung vom Photolinker (Struktur b in Figur 31)



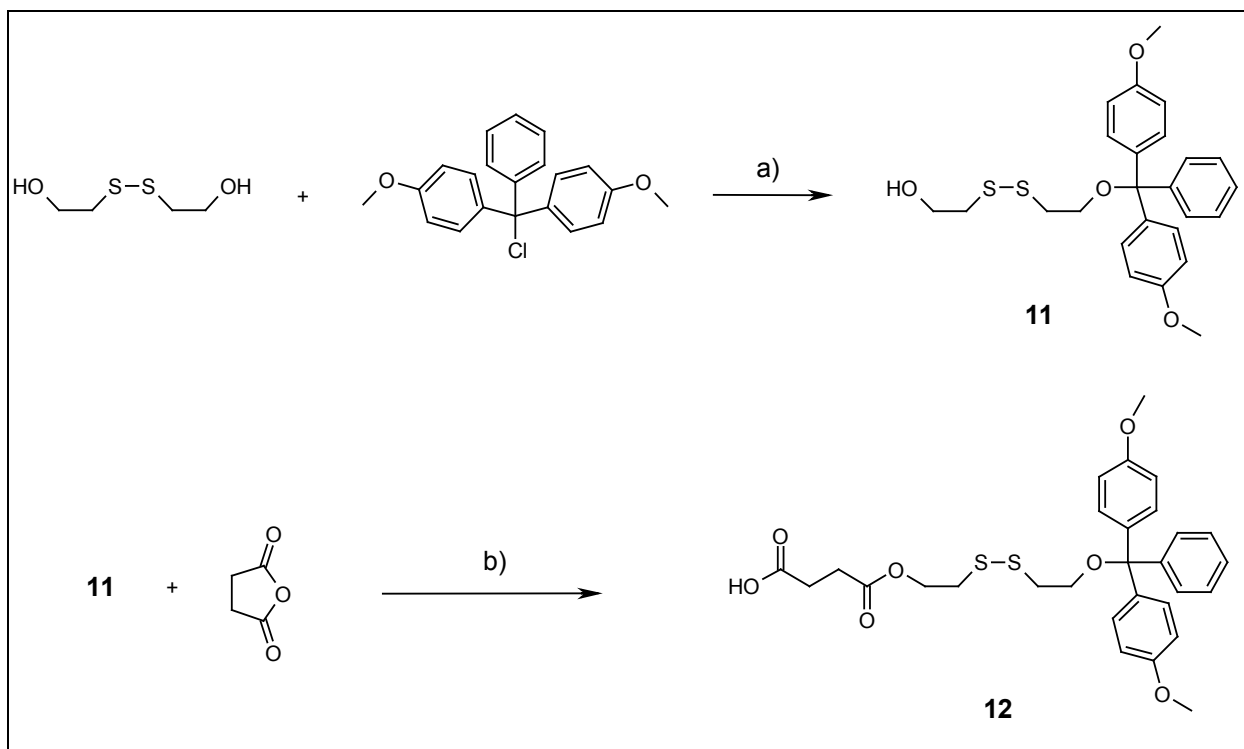
Graphik 2. Kinetikmessung der Abspaltung vom Photolinker RT1095 (Struktur c in Figur 31)

Für die vorliegende Problemstellung eines monoklonalen Antikörpers als Templat oder „Screening-Agent“ von Verbindungen auf Festphase ist ein „traceless“-Linker, d. h. ein Linker, der bei der Abspaltung des Produktes vom Harz keine Überreste am Produkt hinterlässt, nicht unbedingt notwendig, da die Aktivität der Substanzen direkt am Harz gemessen wird. In diesem Fall bedeutet das, dass das Peptid über seine Carboxygruppe am Harz gebunden ist und für eine „Erkennung“ durch den mAB nur mit der C=O-Bindung als Wasserstoffbindungs-Akzeptor zur Verfügung steht. Über welche Art Bindung die Substanzen ans Harz gebunden sind, ist insofern nicht relevant, als dass dieser „Spacer“ nicht zu lang sein sollte, da die Möglichkeit besteht, dass seine funktionellen Gruppen nicht erwünschte Wechselwirkungen mit dem mAB eingehen. Aus diesem Grund wurde eine andere Methode für die Synthese und anschließende Spaltung der Peptide herangezogen; ein Linker mit einer Disulfidbrücke. Erfahrungsgemäss werden S-S-Brücken, falls diese relativ gut

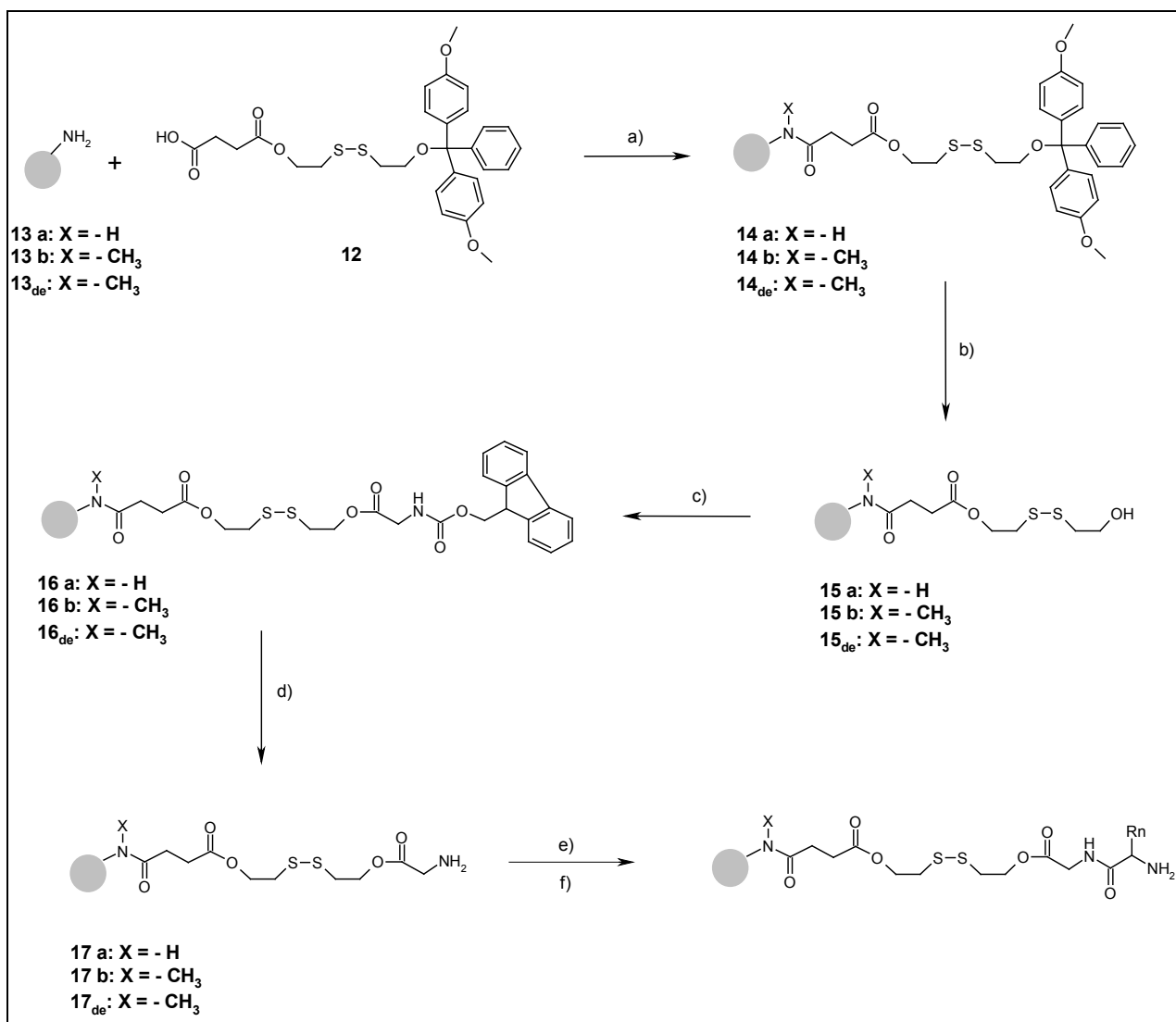
zugänglich sind, durch die Laserenergie des MALDI-MS gespalten. Theoretisch sollte demzufolge auch die Spaltung einer Substanz von einem einzelnen Bead möglich sein.

6.2 Synthese, Evaluation und Anwendung eines Disulfidlinkers 125

Ein einfacher Disulfidlinker, der von Bannwarth & Wippler ¹²⁶ schon als „Purification Handle“ in der Oligonukleotidsynthese on CPG („Controlled Pore Glass“) als Festphase Verwendung fand, wurde hergestellt (**Schema 7**) und mittels einer einfachen kurzen Kopplungs- und -synthesesequenz auf seine Anwendbarkeit in der Peptidchemie geprüft (**Schema 8**). 2,2'-Dithiodiethanol wurde zuerst mit Dimethyltritylchlorid (DMT-Cl) einfach geschützt (**11**) und danach mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt (**12**), um eine freie Säurefunktionalität zu erhalten. Die Kopplung des Linkers (**14 a**) über die Säure geschieht durch Aktivierung mit HATU, HOAt und Hünig Base (Diisopropylethylamin). Um die Beladung zu bestimmen, kann von einem Aliquot des Harzes der Linker gespalten werden (**15 a**) und die Absorption der DMT-Gruppe ($\epsilon_{499} = 71'700$) gemessen werden. Die nachfolgende Esterkopplung der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure (**16 a**) an den Disulfidlinker verläuft quantitativ mit DCC/DMAP und Pyridin als Kopplungsreagenzien. Durch Piperidinbehandlung wird die Fmoc-Gruppe abgespalten (**17 a**) und die Peptidsequenz kann mittels Standard-Peptidchemie fortgesetzt werden.

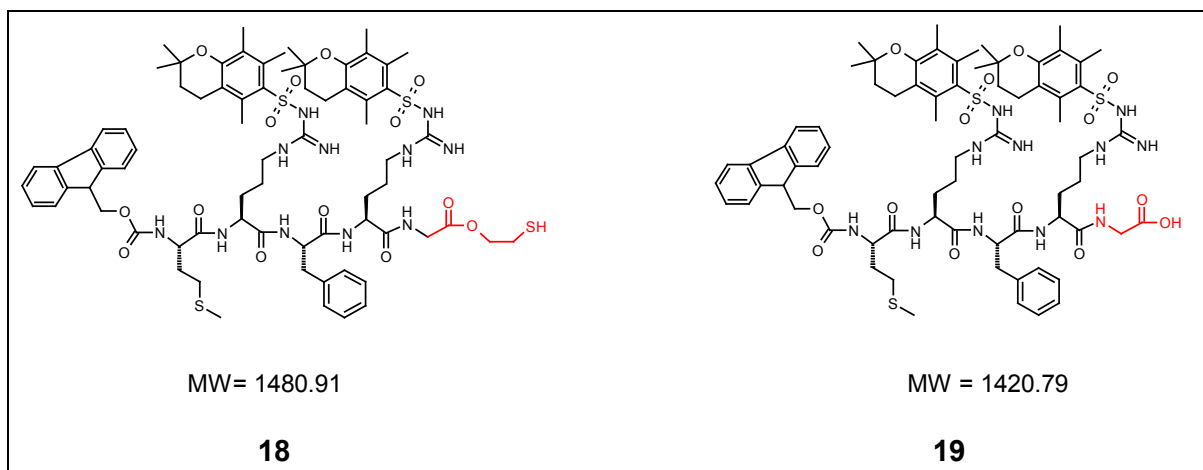


Schema 7. Synthese des Disulfidlinkers. a) Pyridin, Dimethoxytritylchlorid, 20 h, RT, b) Pyridin, DCC, DMAP, CH₂Cl₂, 72 h, RT

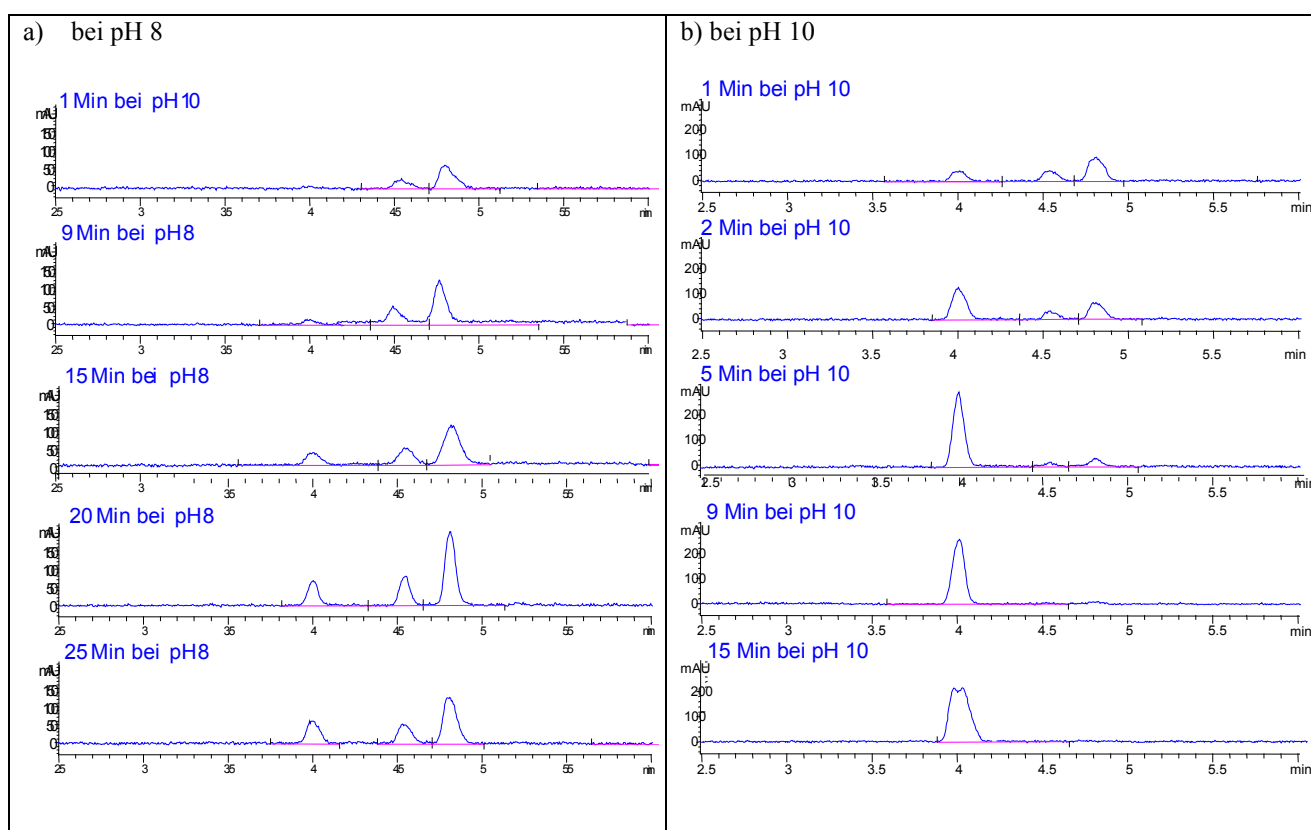


Schema 8. Peptidsynthese mit Disulfidlinker an PEGA-Harz. a) HATU, HOAt, DIPEA, NMP, b) TFA/H₂O/TIPS (95/3/2), c) Fmoc-Glycin, DCC, DMAP, NMP/CH₂Cl₂ 1:1, d) 20 % Piperidin in NMP, e) HATU, HOAt, DIPEA, Fmoc-Aminosäure, f) 20 % Piperidin in NMP

Um die Reinheit der Abspaltung und die Spaltbedingungen zu evaluieren, wurde eine kurze vollkommen geschützte Peptidsequenz synthetisiert und vom Harz abgespalten (**Figur 32**). Aufgrund von MALDI-TOF-MS-Daten der Sequenz Met-Arg(Pmc)-Phe-Arg(Pmc)-Linker wurde entdeckt, dass der Linker unter neutralen bis basischen Bedingungen zur freien Säure hydrolysiert (**19**). Anstelle des erwarteten Moleküls mit dem endständigen Thiol und dem zugehörigen Molpeak bei $(M+H)^+ = 1481$ (**18**) wurde im ISP-MS die Masse $(M+H)^+ = 1421$ gefunden, was auf eine Umlagerung/Hydrolyse zur freien Säure schliessen lässt.



Figur 32. Met-Arg(Pmc)-Phe-Arg(Pmc)-Linker, verschieden abgespalten



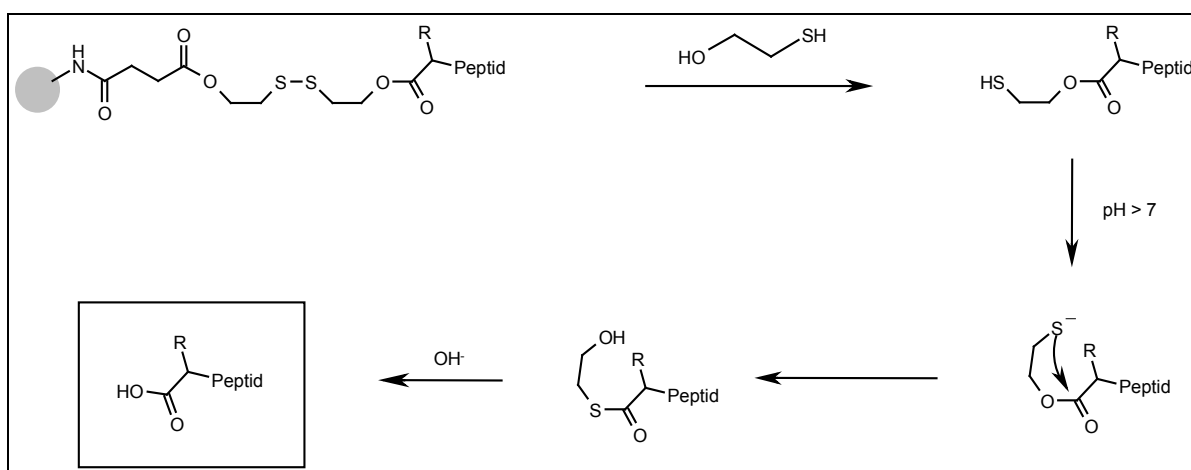
Figur 33. HPLC-Spektren der reduktiven Spaltung des Disulfidlinkers vom Harz: Je ein Aliquot (ca. 10 mg) Harz wurde bei versch. pH-Werten mit 500 μ l 1 % Mercaptoethanol-Lösung versetzt. Je 50 μ l der Spatlösung wurden dann mit 50 μ l 5 % HCOOH gequencht und im HPLC analysiert. Die Spektren wurden bei 460 nm aufgenommen, der Referenzkanal lag bei 550 nm

Zur Untersuchung des Mechanismus der reduktiven Spaltung des Disulfidlinkers wurde ein Dabsyl-modifiziertes Dipeptid hergestellt (**20**, **Figur 34**), welches mit Mercaptoethanol unter verschiedenen basischen Bedingungen behandelt wurde. Während einer Zeitspanne von 20 Minuten wurden mehrere Aliquote der Spatlösung mittels HPLC analysiert (**Figur 33**) und die Fraktionen der Peaks

mittels „Spotting“-Technologie und Reflexions-IR analysiert. Dadurch konnten die HPLC-Peaks den jeweiligen Produkten zugeordnet werden und der wahrscheinliche Spaltmechanismus abgeleitet werden (**Schema 9**).

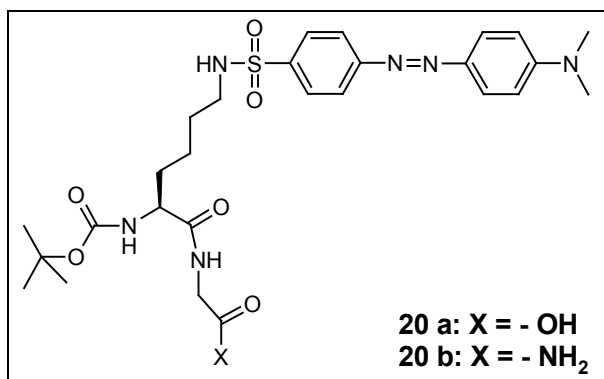
Bei beiden pH-Werten, pH 8 und pH 10, tritt zuerst ein Peak bei 4.8 Min. auf, welcher nach IR-Analyse dem Ester entspricht. Etwa gleich schnell tritt ein Peak bei 4.5 Min. auf, welcher dem umgelagerten Produkt, dem Thioester entspricht und ziemlich kurzlebig ist, da sich der Anteil dieses Produktes nicht akkumuliert, sondern gleich zum Endprodukt bei 4 Min. weiterreagiert. Dieses erwies sich nach IR- und MS-Analyse als korrespondierende Säure.

Der anzunehmende Mechanismus ist in (**Schema 9**) dargestellt. Zuerst wird der Linker reaktiv zum Ester mit freier Thiolgruppe gespalten. Dieser lagert innert Sekunden zum Thioester um, welcher dann unter basischen Bedingungen quantitativ und sehr schnell zur freien Säure hydrolysiert wird.

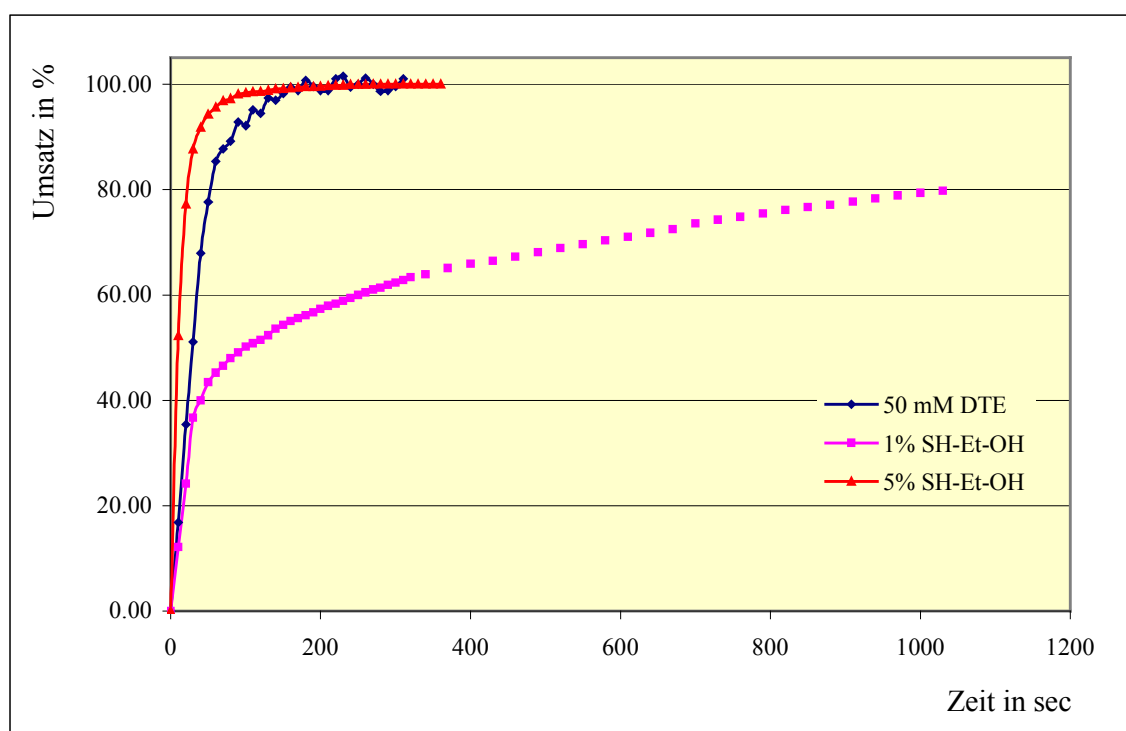


Schema 9. Mechanismus der Hydrolyse: Der Linker wird in einem ersten Schritt reaktiv gespalten, der entstandene Ester mit endständiger Thiolgruppe lagert zum Thioester um und wird schliesslich basisch hydrolysiert.

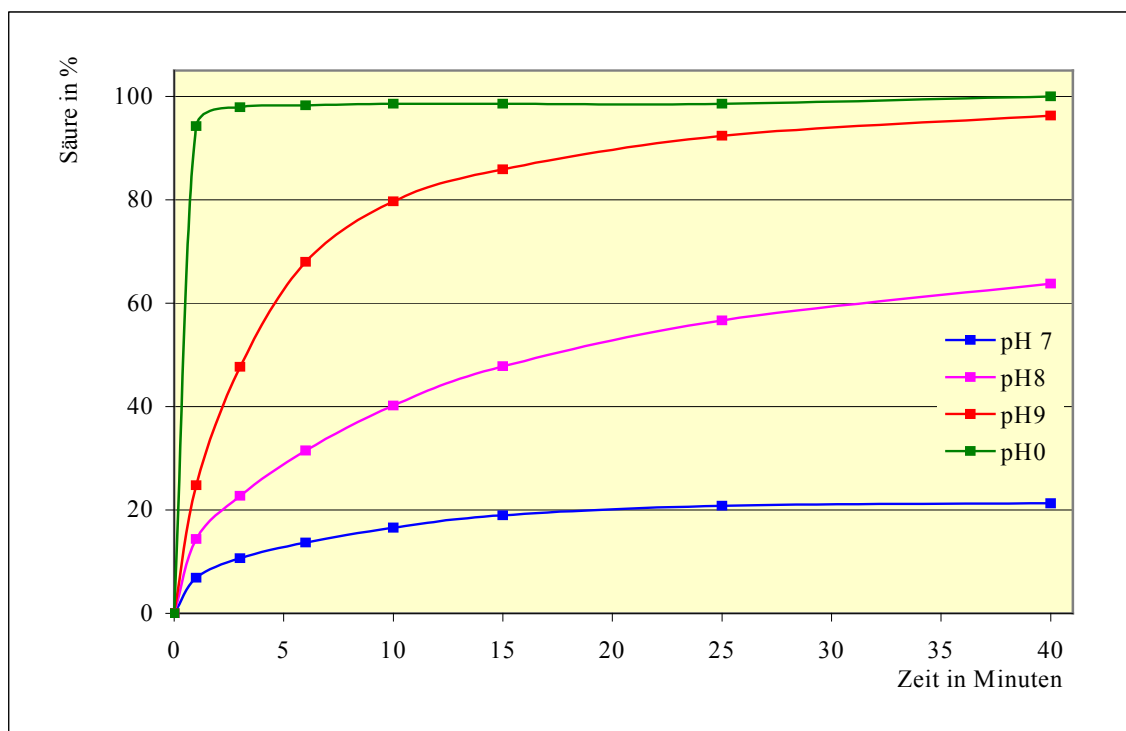
Daraufhin wurde die Kinetik der Abspaltung vom Harz (**Graphik 3**) sowie die Kinetik der nukleophilen Substitution/Hydrolyse untersucht (**Graphik 4**). Zur Durchführung der Kinetikmessungen der Abspaltung (Reduktion) am Harz und der Hydrolyse in neutraler bis basischer Lösung, wurde an PEGA-Harz wieder ein modifiziertes Dipeptid NH_2 -(Dabsyl)Lys(Boc)-Gly-OH hergestellt (**20**, **Figur 34**), dessen Absorption unter Spaltbedingungen bei 466 nm ($\epsilon = 33'000$) UV-spektrophotometrisch und mittels HPLC zeitlich verfolgt wurde.



Figur 34. Dipeptid Gly-(Boc)Lys(Dabsyl)



Graphik 3. Kinetik der Abspaltung vom Harz mit verschiedenen Reagenzien. Aliquote des mit **20** beladenen Harzes wurden mit einem Überschuss an Reagens umgesetzt und die Spaltlösungen werden mit UV quantifiziert.

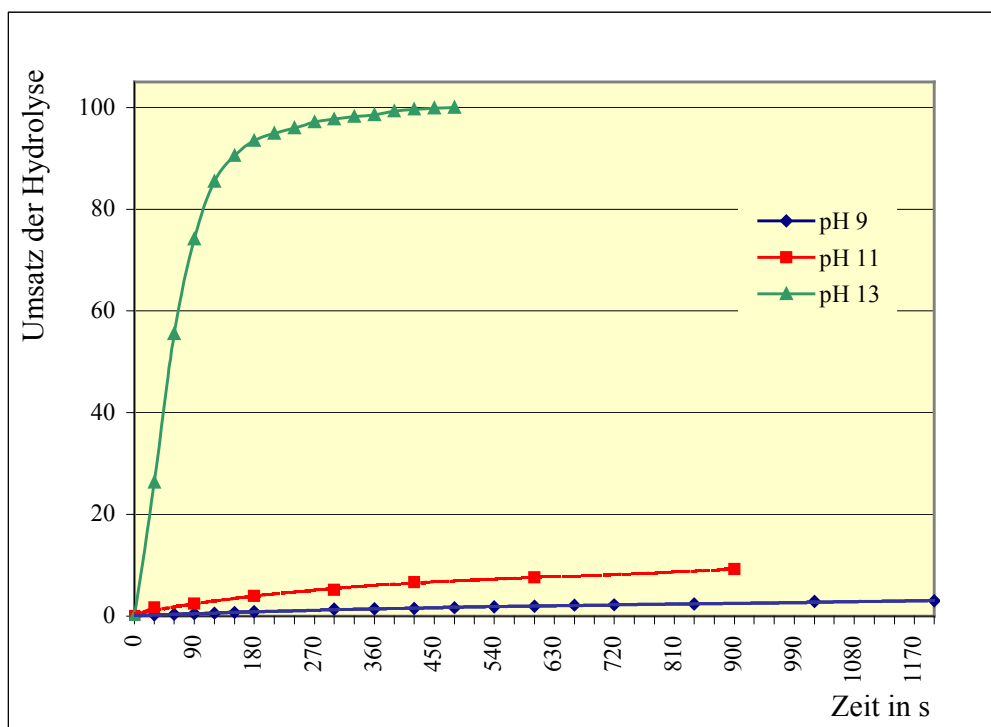


Graphik 4. Kinetik der Hydrolyse. Die Hydrolyse wurde in 50mM DTE in H₂O/ACN 1:1 durchgeführt. Angegeben ist nur die Ausbeute an Säure in %, welche mit HPLC-Analysen detektiert wurde. Die Graphik enthält keine Information über die Quantität der gesamten Spaltung vom Harz.

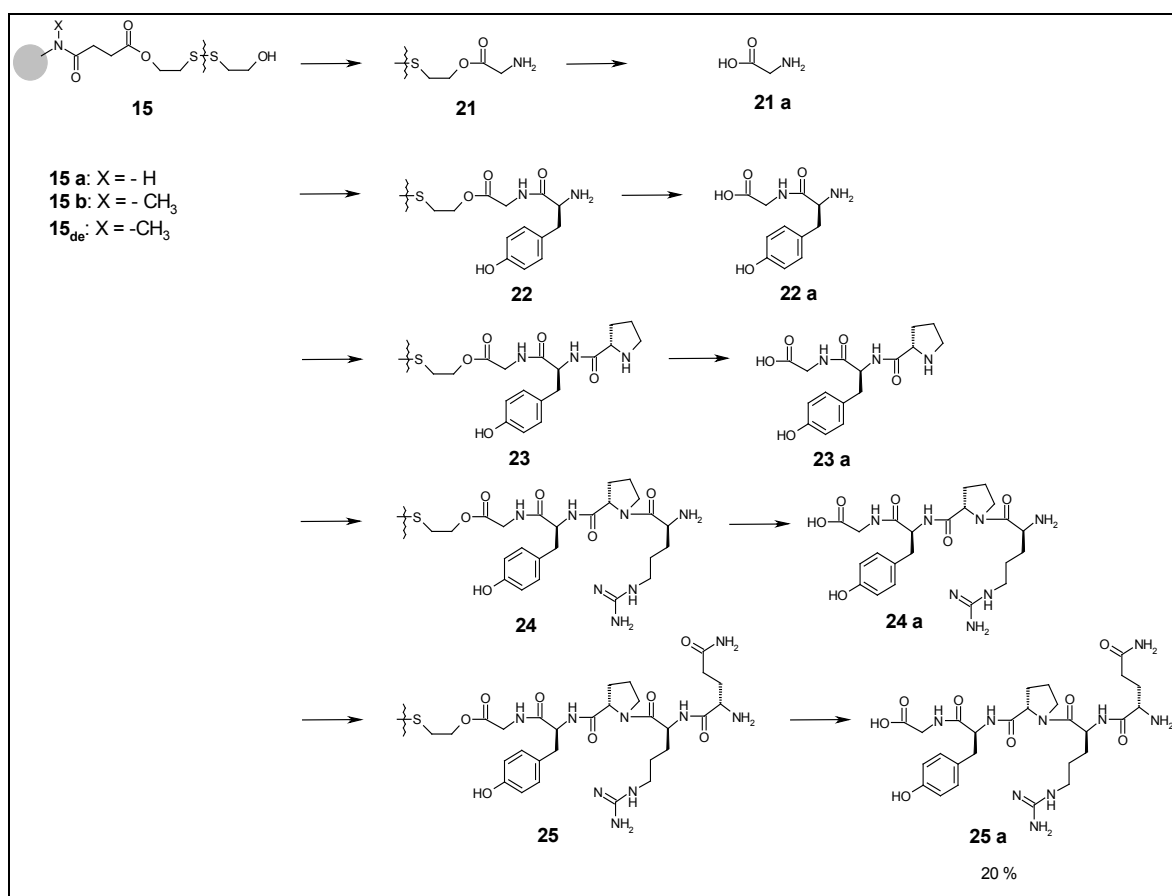
Da die Hydrolyse der Esterbindung unter basischen Bedingungen beschleunigt wird, lag es nahe, die pH-Abhängigkeit im basischen Bereich ohne Reduktionsmittel zu untersuchen (**Graphik 5**). Der Linker ist unter leicht basischem pH stabil, unter stark basischen (wässrigen) Bedingungen erfolgt jedoch sehr schnell Hydrolyse der Esterbindungen am S-S-Linker, wahrscheinlich zu beiden Seiten des Linkers. Dadurch lassen sich auch die Beobachtungen erklären, dass die Beladung des Harzes mit zunehmender Länge der Peptidsequenz abnimmt.

An einer längeren Peptidsequenz NH₂-Lys-Gln-Arg-Cys-Pro-Tyr-Gly-OH in der fünf verschiedene Seitenketten mit fünf verschiedenen Schutzgruppen vorkommen, sollte die Anwendbarkeit von Peptidsynthesen mit schwierigen Sequenzen bewiesen werden. Jedoch haben die nachfolgenden Analysen nicht das gewünschte Produkt ergeben. Wie sich bei späteren Synthesen mit Cystein-haltigen Peptiden herausstellte, konnte keine Cystein-enthaltende Sequenz analysiert werden. Anscheinend ist Cystein mit dem Disulfidlinker nicht kompatibel und führt zu unbekannten Nebenreaktionen.

Anhand einer kurzen Peptidsequenz NH₂-Gln-Arg-Pro-Tyr-Gly-OH (**21 - 25, Schema 10**) wurde die Reinheit der Kopplung nach jeder Stufe mittels HPLC überprüft. Die Kopplungen verliefen annähernd quantitativ, es traten keine Fehlsequenzen auf. Nach der Reinheit des HPLC zu urteilen, ist eine etwaige Bildung von Diketopiperazinen sehr klein. Jedoch betrug die berechnete Beladung durch Abspaltung der Fmoc-Gruppe nur noch 0.03 mMol/g (60 pMol/bead) und per Analyse durch Edman-Abbau nur noch 0.01 mMol/g (20 pMol/bead). Letzteres entspricht nur noch etwa 20 % der ursprünglichen Beladung. Die Diskrepanz zwischen den beiden Beladungsbestimmungsmethoden lässt sich dadurch erklären, dass nach der Piperidinbehandlung Harz mit einer freien Säuregruppe wieder gekoppelt wird und bei Fmoc-Messung zu einer grösseren Beladung führt, als tatsächlich am Linker vorhanden ist.



Graphik 5. Die Hydrolyse wurde in einem Gemisch ACN/H₂O 1:1 durchgeführt. Der pH wurde mit NH₃ eingestellt



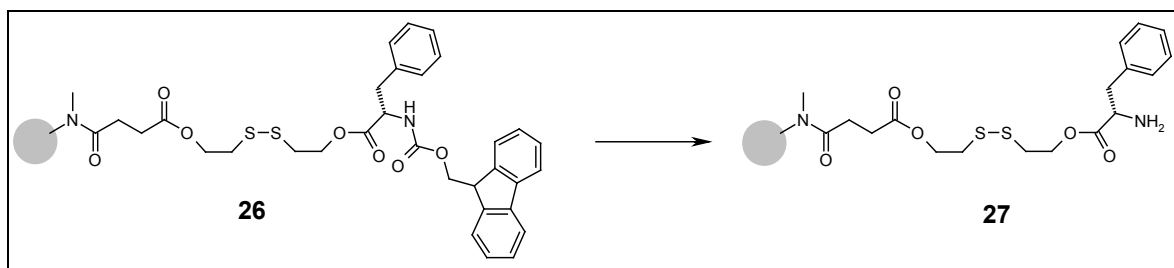
Schema 10. Synthese der Peptidsequenz NH₂-Gln-Arg-Pro-Tyr-Gly-OH und Abspaltung nach jeder Stufe

6.2.1 Modifizierung des Fmoc-Peptidsynthese-Protokolls auf PEGA-Harz

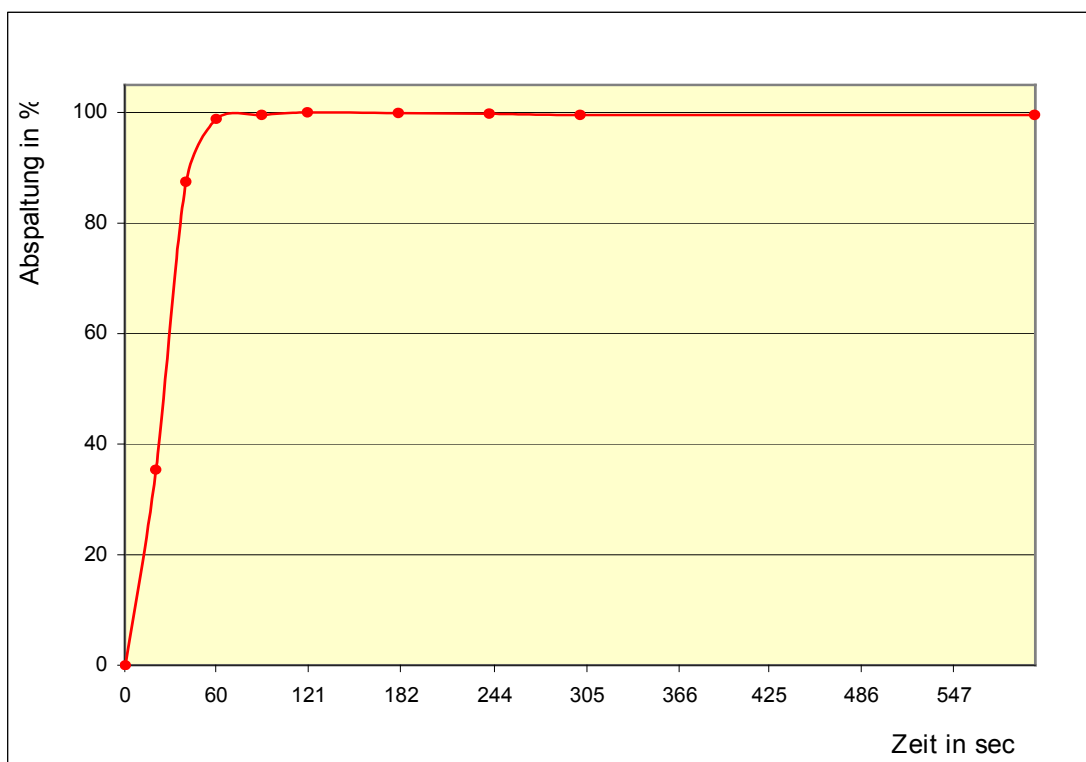
Das Fmoc-Abspaltungsprotokoll wurde für Harze entwickelt, die kompakter sind, eine höhere Beladung haben als PEGA-Harz und nicht so gut für die Reagenzien zugänglich sind. Demzufolge dauert die Diffusion der Lösungsmittel und Reagenzien ins Harz und aus dem Harz länger als bei einem grossporigen Harz mit kleiner Beladungsdichte wie dem PEGA-Harz.

Weil der eingesetzte Disulfidlinker unter basischen Bedingungen gespalten wird und eine kürzere Exposition des Linkers in basischen Milieu zu weniger Verlusten führt, wurde die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe am terminalen Amin genauer untersucht.

Die Fmoc-Abspaltung wurde an einem Aliquot mit N-Methylglycin (Sarcosin) modifizierten PEGA-Harz untersucht, an dem Fmoc-Phenylalanin **26**, (**Schema 11**) gekoppelt war. Die Messung ergab, dass die Abspaltung nach zwei Minuten vollständig ist (**Graphik 6**), wobei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt auch hier die Diffusion des Reagens ins Harz hinein und aus dem Harz hinaus zu sein scheint, da in Lösung die Abspaltung einer Fmoc-Gruppe einige Sekunden dauert. Bei längeren Peptiden oder sterisch gehinderten Ketten ist es möglich, dass die Abspaltungsdauer leicht verlängert wird.



Schema 11. Sarcosin – Disulfidlinker - Fmoc-Phe – modifiziertes Harz zur Evaluierung der Fmoc-Spaltungszeit.



Graphik 6. Kinetikmessung der Fmoc-Abspaltung mittels UV-Messung bei 300 nm

Mit einem modifizierten Fmoc-Peptidsyntheseprotokoll, nur noch 5 Minuten Behandlungszeit mit 20 % Piperidinlösung um die Fmoc-Gruppe abzuspalten, wurde die Sequenz $\text{NH}_2\text{-Gln-Arg-Pro-Tyr-Gly-OH}$ (**21 - 25**, **Schema 10**) noch einmal synthetisiert.

Nach jeder Stufe wurde ein Aliquot des Harzes entnommen und mit 100 mM DTE in $\text{H}_2\text{O/ACN}$ (mit NH_3 auf pH 9 gebracht) vom Harz gespalten (**21** → **21 a**, **22** → **22 a**, **23** → **23 a**, **24** → **24 a**, **25** → **25 a**). Die Reinheit der Kopplungen wurde mittels HPLC kontrolliert. Ein weiteres Aliquot des Harzes wurde nach jeder Kopplung mittels Edman-Abbau sequenziert, um die Beladung am Harz zu bestimmen. Zudem wurde nach jeder Stufe eine Probe mikroanalytisch untersucht². Die Resultate der Untersuchungen sind in **Tabelle 13** zusammengefasst.

Aus dem Vergleich der beiden Analysemethoden lässt sich erkennen, dass die Berechnungsmethode mit Hilfe der Mikroanalyse ziemlich genau ist und ungefähr den Resultaten aus der Edman-Sequenzierung entspricht. Die Reinheit oder Güte der Kopplungen ist bei jedem Schritt relativ gut, jedoch ist offensichtlich, dass die Beladung während der Synthese abnimmt. Für längere Peptidsynthesen ist der Disulfidlinker mit dem Fmoc-Protokoll in der Weise also nicht brauchbar. Obwohl die Reinheit der Produkte sehr gut ist, nimmt die Ausbeute mit zunehmender Peptidlänge zu stark ab.

² Durch Vergleich der C-, H-, N- und S-Gehalte des Harzes vor und nach der Kopplung mit denselben Gehalten der gekoppelten Substanzen, konnte die Beladung des Harzes ziemlich genau bestimmt werden.

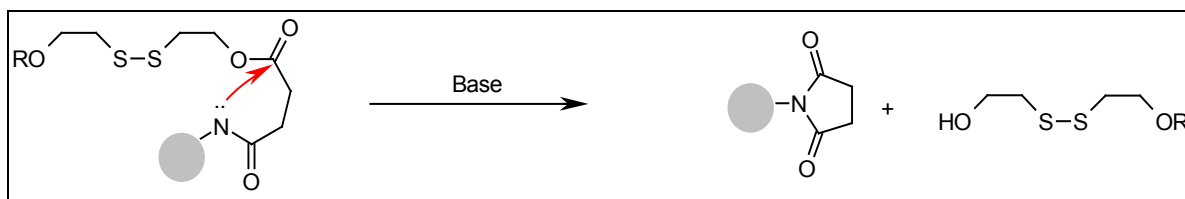
| Kopplungsstufe | HPLC Reinheit | MA (pMol/bead) | Edman (pMol/bead) |
|------------------|---------------|----------------|-------------------|
| 21 → 21 a | 90% | a) | a) |
| 22 → 22 a | 96% | 190 | 180 |
| 23 → 23 a | 92% | 180 | 70 ^{b)} |
| 24 → 24 a | 90% | 130 | 70 ^{b)} |
| 25 → 25 a | 86% | 100 | 100 |

a) Bei der ersten Kopplung nach dem Linker wurde keine quantitative Analyse durchgeführt.
b) Bestimmung von Pro und Arg mittels Edman-Sequenzierung schwierig

Tabelle 13. Untersuchung der Kopplungsausbeuten und –reinheiten mit modifiziertem Fmoc-Protokoll

6.2.2 Verbesserung der Stabilität des Disulfidlinkers

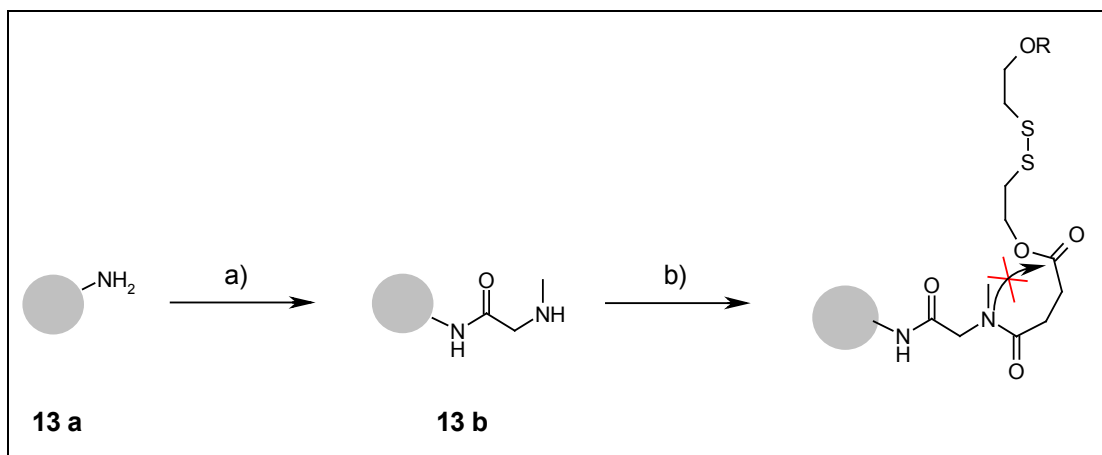
Da unter den gegebenen Bedingungen die bei der Peptidsynthese herrschen, die Esterfunktionen des Linkers nicht hydrolysieren sollten, liegt die Annahme nahe, dass der Linker nicht nur bei der Piperidinbehandlung zur Fmoc-Entschützung leidet, sondern schon unter den Bedingungen, die während den Peptidkopplungen herrschen, durch eine intramolekulare Reaktion partiell hydrolysiert wird ¹²⁷. Der folgende Mechanismus wird angenommen (**Schema 12**).



Schema 12. Intramolekulare Hydrolyse des Linkers. Angriff des Amid-Stickstoffes am Harz an die

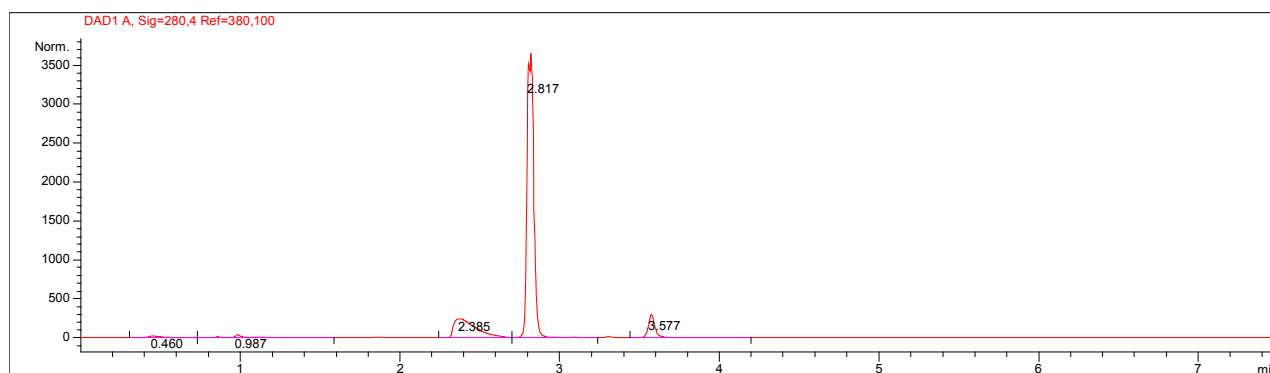
6.2.2.1 Einführung eines Sarcosin-Bausteins

Um diese unerwünschte Reaktion zu unterbinden, wurde das Harz (**13 a**) zuerst mit einem Sarcosinbaustein (N-Methyl-Glycin) modifiziert (**13 b**) (**Schema 13**). Die im Gegensatz zum Wasserstoff sterisch anspruchsvollere Methylgruppe verhindert den in **Schema 12** dargestellten intramolekularen Angriff des freien Elektronenpaares des Amidstickstoffs auf den Ester.



Schema 13. Modifizierung des PEGA-Harzes mit Sarcosin und Verhinderung einer Hydrolyse: a) i: Fmoc-Sarcosin, HATU, DIPEA, NMP, 1 h, RT; ii: 20 % Piperidin in NMP, RT, 20 Min.; b) fortsetzen der Peptidkette

Um die Wirkung dieser Massnahme zu testen, wurde wiederum (in einer Doppelkopplung) der Disulfidlinker an PEGA-Harz gekoppelt und daran das Pentapeptid $\text{NH}_2\text{-Gln-Arg-Pro-Tyr-Gly-OH}$ synthetisiert (**Schema 10**). Die Fmoc-Messung des Sarcosin-modifizierten Harzes mittels UV-Spektroskopie ergab eine anfängliche Beladung von 0.15 mMol/g Harz (300 pMol/bead). Auch die Edman-Analyse der Beads ergab eine durchschnittliche Beladung von 300 pMol/bead. Durch die Einführung des Sarcosin-Bausteins wurde also eine quantitative Kopplung aller daran folgenden Bausteine erreicht. Die Reinheit des abgespaltenen Peptids ist wie bei den vorhergehenden Experimenten sehr hoch (**Figur 35**) und nach saurer Abspaltung der Schutzgruppen wurde mit ca. 20 Beads ein Routine-ISP-MS aufgenommen, das gut sichtbar den Molpeak $M^+ = 620$ zeigte.



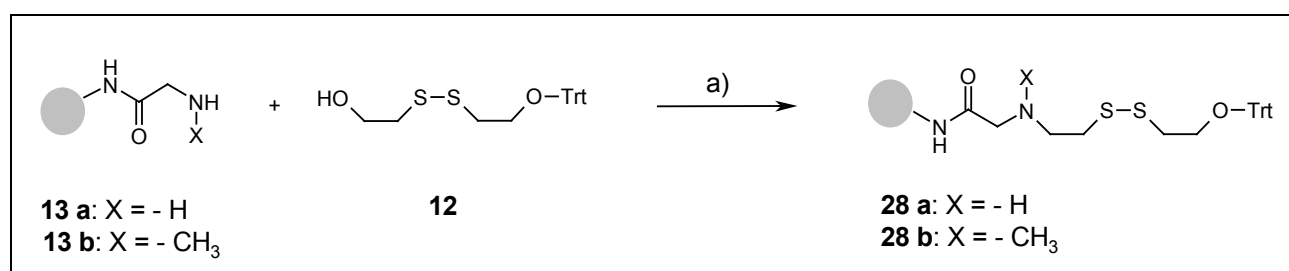
Figur 35. HPLC-Spektrum des abgespaltenen Tetrapeptids (direkt Spalltlösung injiziert)

Auch eine nachfolgende Single-Bead-Analyse mittels MALDI-TOF-MS und ISP-MS war erfolgreich. Das Molekülion konnte mit und ohne Schutzgruppen sehr gut nachgewiesen werden, auch konnte das Peptid mittels Tandem-MS sequenziert werden.

6.3 Synthese eines Disulfidlinkers auf Festphase

6.3.1 Mitsunobu-Kopplung ^{128, 129}

Aufgrund der Basenlabilität des bisher benutzten in Lösung hergestellten Disulfidlinkers wurde eine Alternativroute zur Synthese eines entsprechenden Linkers am Harz gesucht. Mittels einer Mitsunobu-Reaktion sollte das partiell trityl-geschützte 2,2'-Dithiodiethanol direkt ans Harz gekoppelt werden. Ein Ansatz ging direkt vom unmodifizierten PEGA-Harz aus (**13 a**), ein anderer von N-Methylglycin (Sarcosin)-modifiziertem PEGA-Harz (**13 b**) (Schema 14).



Schema 14. Alternative Kopplung des Disulfidlinkers per Mitsunobu Reaktion. Reaktionsbedingungen: a) PPh_3 , DEAC, Toluol, RT, 24 h

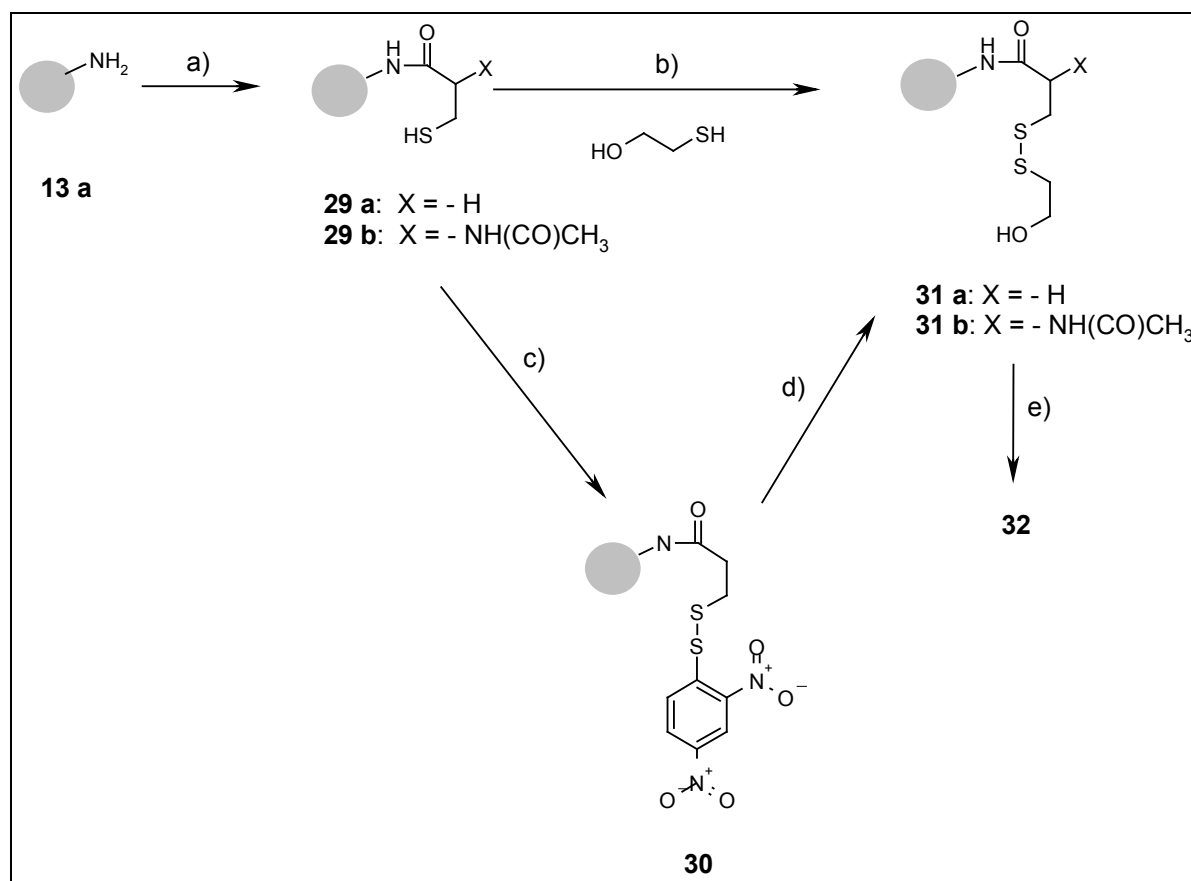
Die Güte der Kopplung wurde quantitativ durch Mikroanalyse des Harzes (Nachweis des Schwefelgehaltes) und qualitativ durch Abspaltung der Tritylgruppe mit TFA kontrolliert. Im Fall A wurde mit beiden Methoden keine Kopplung festgestellt, im Fall B ergab die Abspaltung eine leichte Rotfärbung durch das Tritylkation, die MA ergab aber auch keine Kopplung. Da überhaupt keine Anzeichen für eine baldmögliche erfolgreiche Durchführung dieser Reaktion bestanden, wurde dieser Ansatz eingestellt.

6.3.2 Sequenzielle Synthese des Linkers am PEGA-Harz

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, den Linker sequenziell direkt am Harz herzustellen (Schema 15). Ans PEGA-Harz wurde über eine Amidkopplung ein Cystein oder ein Cysteinanalogenes gekoppelt (**29 a**, **29 b**). Über eine Disulfidbrücke sollte daran Mercaptoethanol gekoppelt (**31**) werden. Die Kopplung des Cysteins wurde mittels einer Standard-Peptidkopplung durchgeführt. Es wurde versucht die Disulfidbildung mit verschiedenen Oxidationsreagenzien durchzuführen, mit denen eine ähnliche Oxidation in flüssiger Phase schon beschrieben wurde. Einerseits mit Luftoxidation, Jod ^{130, 131, 132}, AgNO_3 , $\text{Cu(NO}_3)_2$ ¹³³, NaTeO_2 ¹³⁴ und $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_6$ ¹³⁵, andererseits über einen Zwischenschritt mit 2,4-Dinitrobenzolsulfonylchlorid welches zu

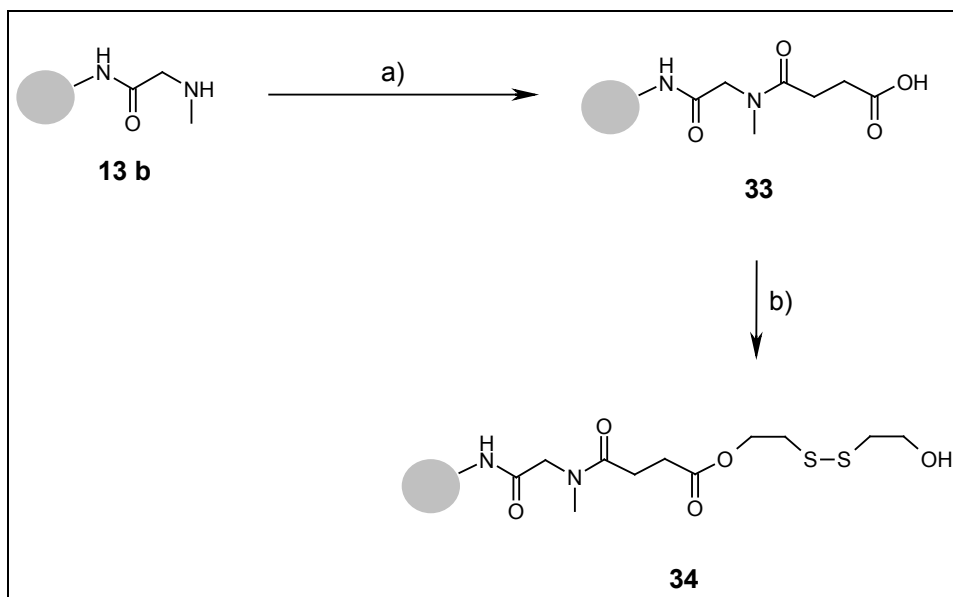
einem reaktiveren Intermediat (**30**) führen sollte ¹³⁶. Zur quantitativen Analyse wurde an die Linker jeweils ein kurzes Peptid synthetisiert (**32**), mittels Edman-Abbau analysiert oder das Harz wurde mikroanalytisch untersucht. Bei den direkten Oxidationsmethoden b) wurde nur nach dem Einsatz von AgNO₃ eine zufriedenstellende Kopplung festgestellt. Diese führt zu einer Beladung von 260 – 300 pMol/Bead (0.15 mMol/g). Bei Verwendung der anderen Oxidationsmittel kann keine oder nur eine marginale Oxidation festgestellt werden. Zudem birgt der Einsatz von diesen Salzen präparative Nachteile, da schwerlösliche Salze ausfallen, die das Harz teilweise verstopfen oder zerstören und auch nach intensivem Waschen mit verschiedenen Lösungsmitteln nicht mehr herausgelöst werden können.

Die Beladung bei Verwendung der Methode über das 2,4-Dinitrobenzoldisulfidintermediat (**30**) betrug ca. 200 pMol/Bead und wurde durch reproduzierbare Edman-Sequenzierung einer kurzen Peptidsequenz ermittelt.



Schema 15. Disulfidlinkersynthese direkt auf PEGA-Harz: a) i: Trityl-Cystein, HATU, DIPEA, NMP, 1 h, RT; ii: 50 % TFA, 1 h, RT; b) Disulfidkopplungen mit versch. Oxidationsmitteln; c) 2,4-Dinitrosulfonylchlorid; d) Mercaptoethanol e) DCC, DMAP, Pyridin, CH₂Cl₂, RT, 4 h.

Da sich eine Linkersynthese direkt auf dem Harz mit einer oxidativen Bildung der S-S-Brücke oder mittels einer Mitsunobu-Reaktion als nicht effizient oder für Festphasensynthese ungeeignet erwies, wurde versucht, die Synthese des Disulfidlinkers wie sie in Lösung erfolgt, auf Festphase zu übertragen (**Schema 16**).



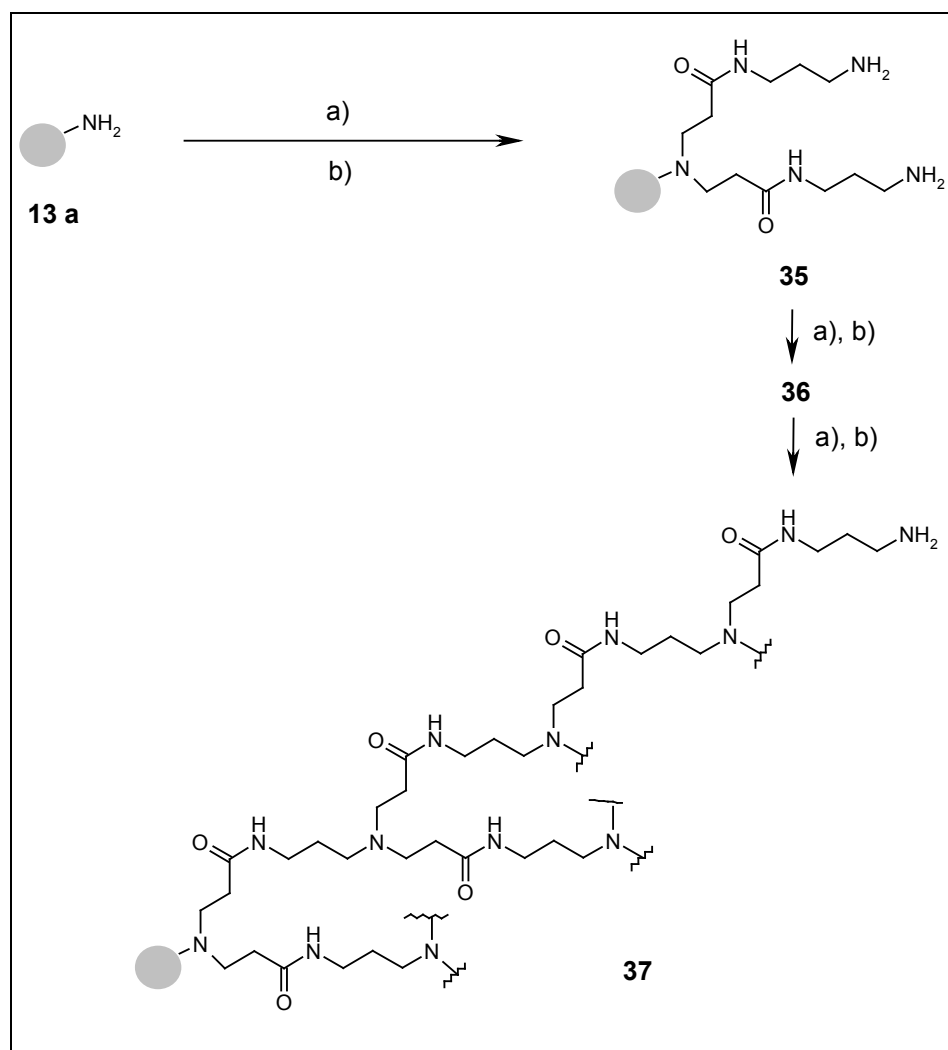
Schema 16. Transfer der Disulfidlinkersynthese von Lösung auf Festphase. a) Succinanhydrid, Pyridin, 20 h, RT; b) DCC, DMAP, Pyridin, 16 h, RT

Im ersten Schritt wird das mit Sarcosin modifizierte Harz **13 b** mit Succinanhydrid umgesetzt und die entstandene Säure **33** mit einem grossen Überschuss an Dithiodiethanol umgesetzt. Dadurch und durch die allgemein niedrige Beladung von Festphasenmaterialien wird eine intramolekulare Vernetzung vermieden. Die Vollständigkeit der Umsetzung zum Alkohol **34** wurde mit einem Kaiser-Test nachgewiesen. Die Beladungsmessung des Harzes (insb. die Ausbeute der Kopplung von Dithiodiethanol) erfolgt einerseits mit Mikroanalyse andererseits per Edman-Abbau eines kurzen Peptids. Die erreichte Beladung liegt bei ca. 0.44 mMol/g (90 pMol/Bead), was nicht ganz dem normalerweise erreichten Wert nach einer Kopplung des fertigen Linkers ans Harz entspricht. Nach einer vierstufigen Synthese (inkl. Sarcosinkopplung und Entschützung) kann jedoch erwartet werden, dass es Verluste gibt und die Beladung für eine weiterführende Synthese nicht mehr den ursprünglichen Wert aufweist.

6.3.3 Erhöhung der Beladung mittels Dendrimeren

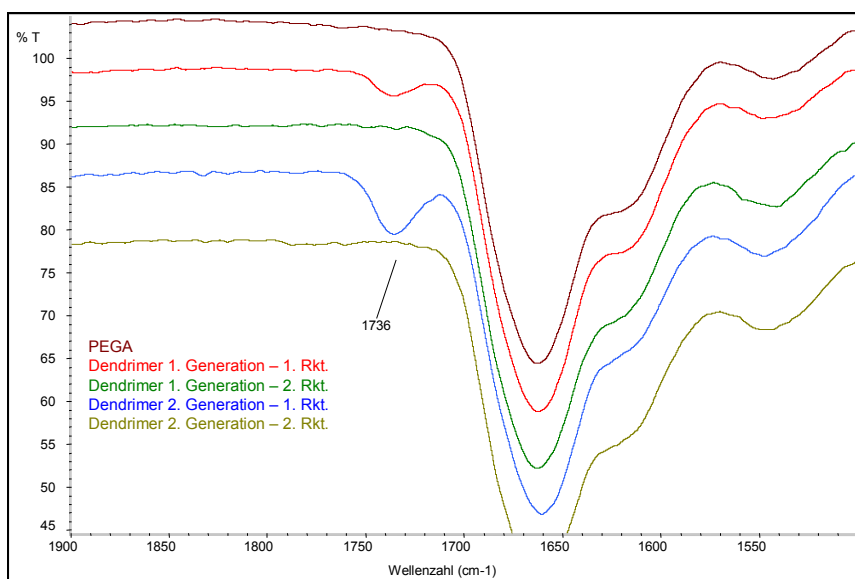
Ein alternativer Ansatz zur Erhöhung der Beladung für eine eventuelle Erweiterung der Analytik am Harz (evtl. Single-Bead-HPLC) ist die Synthese von Dendrimeren am Harz. Diese sollten einfach herzustellen und chemisch inert gegenüber den folgenden (Peptid-) Synthesebedingungen sein. Bradley et.al¹³⁷ entwickelten zur Erhöhung der Beladung von Amino-funktionalisierten Harzen eine Methode, bei der über eine Michael-Addition Acrylsäuremethylester an das Harz addiert wird und der entstandene Methylester mit 1,3-Diaminopropan nucleophil substituiert wird

(**Schema 17**). Dabei entstehen zwei primäre Amine. Mit jedem Zyklus wird so die theoretische Beladung verdoppelt.



Schema 17. Dendrimerisierung von PEGA-Harz a) Methylacrylat, MeOH, kat. FeCl_3 , RT; b) 1,3-Diaminopropan, RT

An unsubstituiertem PEGA-Harz (**13 a**) wurde die Dendrimerisierung in 3 Zyklen zu **35 – 37** vorgenommen. Die Güte der Kopplungen kann einerseits nach jeder Addition von Methacrylat mit einem Kaiser-Test auf ein Verschwinden von 1° Aminen, andererseits mittels ATR-IR-Spektroskopie direkt auf dem Bead analysiert werden. Dabei treten charakteristische Estersignale bei 1735 cm^{-1} auf, die verfolgt werden können (**Figur 36**).



Figur 36. Verfolgung des Reaktionsablaufes der Dendrimerisierung während zwei Zyklen anhand der Esterbande bei 1735 cm^{-1} mittels ATR-IR.

Auf dendritisch über drei Zyklen modifiziertem Harz wurde wiederum an einem Disulfidlinker die kurze Peptidsequenz $\text{NH}_2\text{-Gln-Arg-Pro-Tyr-Gly-OH}$ (**25 a**, **Schema 10**) synthetisiert und mittels Edman-Abbau analysiert. Die Beladungsbestimmung ergab eine Beladung von 500 pMol/bead über alle fünf Aminosäuren. Bei einer maximalen Beladung von 200 pMol/bead würde man nach 3 Zyklen mit quantitativer Verdopplung eine Beladung von 1600 pMol/bead erwarten. Folglich beträgt die durchschnittliche Kopplungsausbeute nur ca. 35 % und die intramolekulare Vernetzung auf dem Bead muss als beträchtlich angenommen werden.

6.4 „Single-Bead“ MS Analyse

Die Evaluation der geeignetsten Bedingungen zur Analyse von Peptiden auf dem Harz mittels massenspektrometrischer Methoden wurde im „Trial & Error“-Verfahren ermittelt. Es wurde mit einigen Aliquoten Harz mit darauf synthetisierten kurzen Peptiden (Tetra – bis Heptapeptide) versucht, diese direkt auf dem Harz mittels MALDI-TOF-MS zu messen, also ohne vorherige Abspaltung des Peptides vom Harz. Da schon Beispiele für eine „on-bead“-Abspaltung im MALDI-TOF existierten und auch schon beobachtet wurde, dass bei der Messung von Oligopeptiden und Proteinen die Cystinbindungen gespalten werden¹¹⁸, wurde angenommen, dass durch die Energie des Lasers die Disulfidbindungen gespalten werden und das Peptid mit einem Linkerteil als Thiol nachgewiesen werden könnte. Experimente haben aber gezeigt, dass mittels direkter Messung der Beads ohne vorherige Abspaltung der Peptide im MALDI-TOF-MS die Peptide nicht nachgewiesen werden können. Im nachfolgenden werden einige Beispiele aus der Entwicklung der „Single-Bead“-Analyse aufgezeigt.

- Analyse von Dipeptid Gly-(Boc)Lys(Dabsyl) (**20**, **Figur 34**)

Mit MALDI-TOF wurde kein Molekölion gefunden. Weder aus einer Spalltlösung von ein paar hundert Beads, noch aus einer Spalltlösung eines einzelnen Beads.

Mit ISP ist das Molekölion sehr gut wiederzufinden. Einerseits aus einer Spalltlösung von ein paar hundert Beads, andererseits mit Single-Bead-Untersuchung, für die ein einzelnes Bead mit 2.5 µl 50 µM DTE-Lösung in ACN/H₂O behandelt wurde. Nach 30 Minuten wurde die Lösung mit 20 µl ACN auf ¹/₁₀ verdünnt und mit ESI-MS gemessen.

- Analyse von Peptidsequenz NH₂-Gln-Arg-Pro-Tyr-Gly-OH (**25 a**, **Schema 10**)

Im MALDI-TOF-MS aus einer Lösung von einem Aliquot Beads sind neben dem Molekölion noch Ionen mit den Massen (M+Na)⁺, (M+K)⁺, (M+2Na)⁺, (M+Na+K)⁺, sowie das Peptid mit dem Pmc-geschützten Arginin zu erkennen. Eine MALDI-TOF-MS-Analyse eines Beads mit vollständig geschütztem Peptid liefert das Molekölion, sowie das Molekölion minus die Pmc-Schutzgruppe.

Auch eine Single-Bead Analyse mit MALDI-TOF und ISP-MS war erfolgreich. Das Bead wurde 10 Min. mit 5 µl 25 % NH₄OH-Lösung behandelt und diese Lösung wurde analysiert. Im MALDI-TOF sowie im ISP-MS sind die Molekölionen der entschützten Peptid-Amine zu sehen.

Im MALDI-MS sind die Molekölionen des vollständig entschützten Peptids und des Peptids mit Pmc-Schutzgruppe am Arginin zu sehen, obwohl ein HPLC der Spalltlösung eine fast quantitative Abspaltung der Schutzgruppen zeigt. Auch ein ISP-MS zeigt einen dominierenden Peak der partiell entschützten Sequenz mit der noch vorhandenen Pmc-Schutzgruppe. Dies zeigt ein weiteres Problem der Analyse von Substanzen auf einzelnen Beads auf, nämlich die unterschiedlichen Ionisierbarkeiten der verschiedenen Produktklassen und der mögliche Störeinfluss von Verunreinigungen.

Bemerkenswert ist weiter, dass eine Messung gleich nach der Synthese das exakte Molekölion lieferte und eine Messung einige Wochen nach der Synthese ein Molekölion mit M+16 lieferte. Aus Fragmenten in einem Tandem-MS-Experiment konnte auf eine Oxidationsreaktion am Tyrosinbaustein geschlossen werden.

Dieselben Beads ergaben nach Behandlung mit 5 % Mercaptoethanol in ACN keine Signale im MS. Da der Disulfidlinker aber für die schonende Spaltung mit einem Reduktionsmittel (wie DTE, Mercaptoethanol) entwickelt worden war, wurde die Spaltung unter Anwendung eines Reinigungsschrittes mittels ZipTip-Pipettenspitzen ¹³⁸ optimiert.

6.4.1 Optimierte Bedingungen für die MS-Analyse

Die auf dem Harz synthetisierten Peptide wurden mittels ESI-MS und MALDI-TOF-MS von je einem einzelnen Bead analysiert. Die Präparation eines „Single-Bead“ zur Analyse mit MS geschieht wie folgt:

- i) Ausgiebiges Waschen der Beads mit verschiedenen LM.

- ii) Waschen eines Schmelzröhrchens mit Acetonitril mittels einer μ l-Spritze.
- iii) Separierung und Überführung eines einzelnen Beads in das Schmelzröhrchen unter dem Mikroskop.
- iv) Zugabe von 5 μ l 25 % NH_4OH
oder
5 μ l 1 % Mercaptoethanollösung und nach 2 Minuten 2 μ l 1 % NH_4OH
- v) Kurzes Zentrifugieren des Schmelzröhrchens um sicherzugehen, dass sich das Bead in Lösung befindet.
- vi) Evtl. kurze Ultraschallbehandlung des Röhrchens.
- vii) Nach ca. 30 Minuten werden noch 5 μ l 40 % Ameisensäure zugegeben.
- viii) Auf dieser Stufe ist die Aufbewahrung im Tiefkühler bis zur Analyse möglich.

Reinigungsschritt:

- ix) ZipTip¹³⁸ zuerst ca. 5 x mit Lösung B spülen.
- x) Das Material ca. 5 x mit Lösung A konditionieren.
- xi) Das Peptid mit Lösung A verdünnen, so dass die Konzentration von ACN < 5 % wird.
- xii) Peptid auf dem Material absorbieren durch mehrmaliges Aufziehen und Ausstossen der Spaltlösung.
- xiii) Das Peptid durch Aufziehen und Ausstossen mit 3 μ l Lösung B wieder vom Trägermaterial lösen.
- xv) Lösung ist bereit zur Analyse.

Lösung A: 5 % Ameisensäure aq.

Lösung B: 5 % Ameisensäure, 60 % ACN, aq.

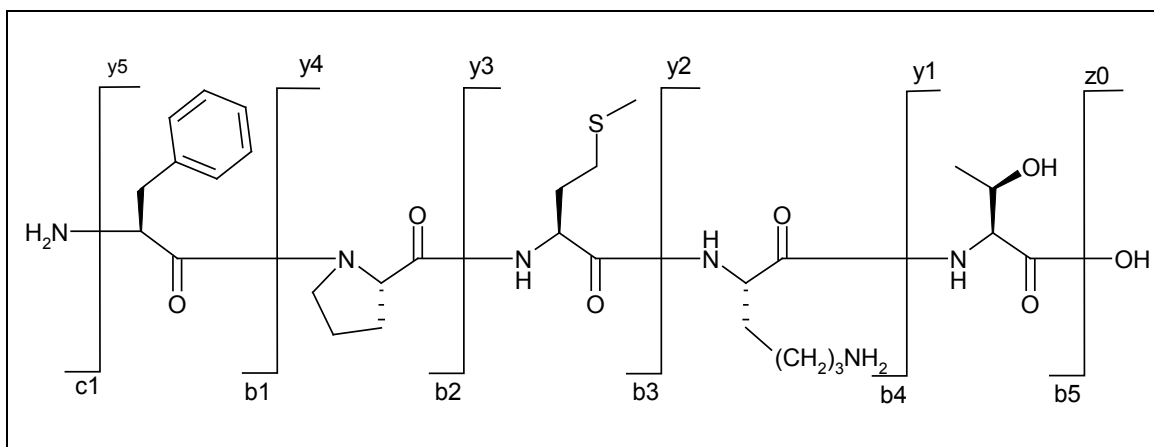
6.4.2 Strukturbestimmung von Peptiden auf einzelnen Beads mit Tandem-MS („Single-Bead“ MS-Analyse)

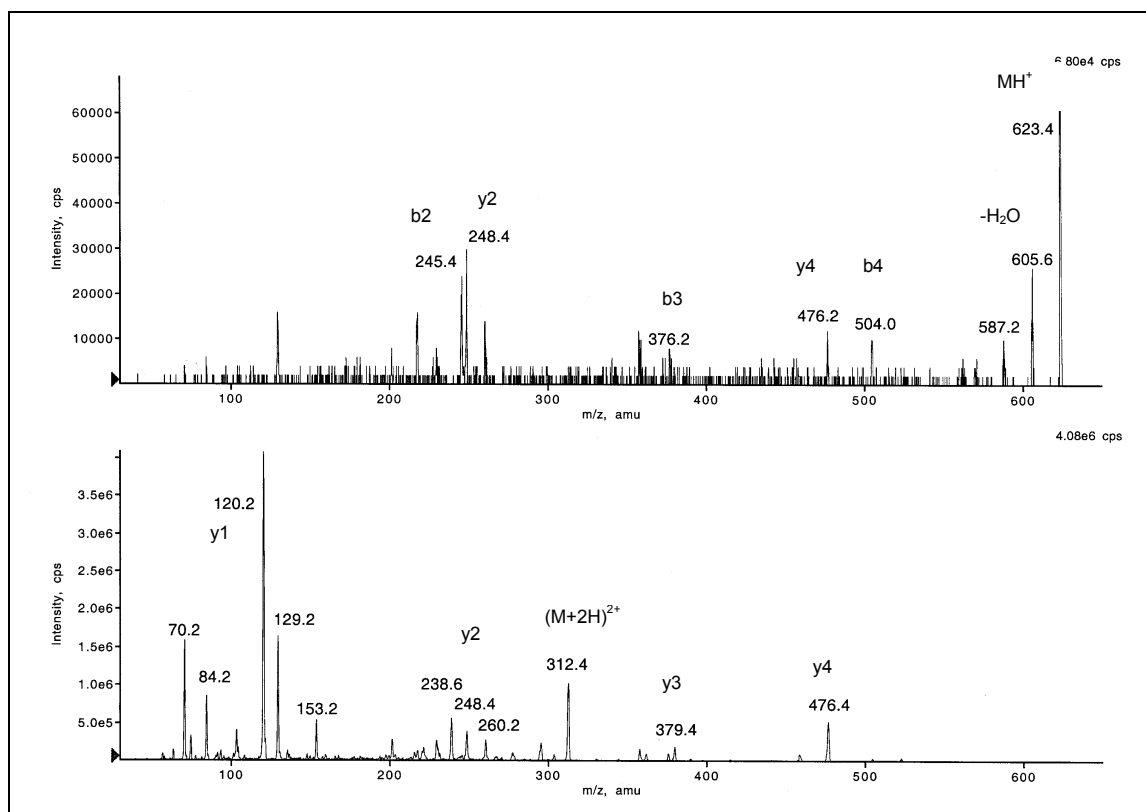
Um die optimierten Bedingungen für die Peptidabspaltung vom Harz zu überprüfen, wurden einige Penta- bis Heptapeptide (**25 a**, **40 – 48**) hergestellt und mittels Tandem-MS analysiert. In **Tabelle 14** sind die Aminosäuresequenzen der untersuchten Peptide sowie ihre berechnete und gemessene Molmasse aufgeführt.

| | Sequenz | Spaltung mit Mercaptoethanol | |
|---|---|------------------------------|-----------------------------|
| | | berechnet (M+H) ⁺ | gemessen (M+H) ⁺ |
| 25 a | NH ₂ -Gln-Arg-Pro-Tyr-Gly-OH | 620 | 620 |
| 40 | NH ₂ -Phe-Pro-Met-Lys-Thr-OH | 623 | 623, 639 |
| 41 | NH ₂ -Cys-Arg-Asn-Asp-Cys-OH | 608 | (a) |
| 42 | NH ₂ -Trp-Tyr-Ser-His-Glu-OH | 721 | 721 |
| 43 | NH ₂ -Met-Phe-Gln-Gly-Ile-OH | 595 | 595 |
| 44 | NH ₂ -Phe-Leu-Ser-Val-Arg-OH | 621 | 621 |
| 45 | NH ₂ -Gly-Ala-Arg-Cys-Phe-OH | 553 | (a) |
| 46 | NH ₂ -Cys-Gly-Ala-Arg-Cys-Phe-OH | 656 | (a) |
| 47 | NH ₂ -Ile-Gly-Glu-Pro-His-OH | 552 | 552 |
| 48 | NH ₂ -Ala-Asn-Ile-Gly-Glu-Pro-His-OH | 737 | 737 |
| (a) kein Molpeak mit Cystein-haltigen Peptiden erhalten | | | |

Tabelle 14. Sequenz mit berechneten und gemessenen Molpeaks

Da Peptide im MS einfach und doppelt ionisiert werden können und in ihren ionisierten Zuständen jeweils verschiedene Fragmente bilden, die detektiert werden können, ist es möglich, aus dem Puzzle von Molmassen die korrekte Aminosäuresequenz zu bestimmen. In **Figur 37** ist exemplarisch anhand des Pentapeptids NH₂-Phe-Pro-Met-Lys-Thr-OH (**40**) die Spaltung in die verschiedenen Fragmente, sowie die erhaltenen Spektren für die Ionisierung der einfach und doppelt geladenen Peptide dargestellt. Die Ionisierung der doppelt geladenen Moleküle ergibt vorzugsweise y-Fragmente (oberes Spektrum), währenddem eine Ionisation des Molpeaks charakteristische b-Fragmente ergibt (unteres Spektrum).





Figur 37. Fragmentierung und Tandem-MS-Spektrum anhand eines Pentapeptids Phe-Pro-Met-Lys-Thr.

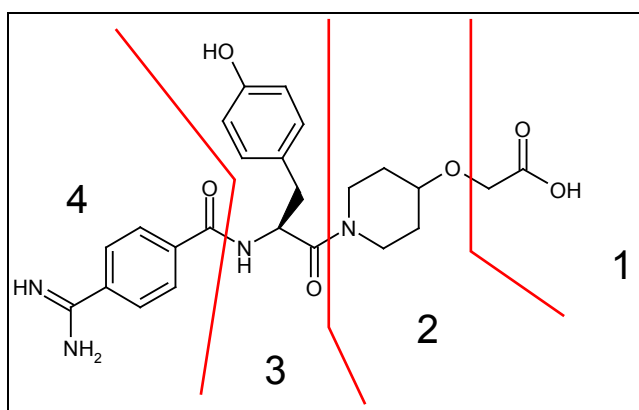
In **Tabelle 15** sind die erhaltenen Fragmente der in **Tabelle 14** aufgeführten Peptide dargestellt. Wie man erkennen kann, sind die erhaltenen Daten für die verschiedenen Peptide ziemlich inhomogen, nicht bei allen Peptiden konnten alle Fragmente nachgewiesen werden, jedoch reichen sie in allen Fällen zur Rekonstruktion der Aminosäuresequenz aus.

| Sequenz | Molpeak | b-Fragmente | | | | y-Fragmente | | | | |
|-----------------------------|----------|-------------|-----|-----|---------|-------------|-----|-----|-----|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Gln-Arg-Pro-Tyr-Gly | 620 | | 285 | | | | | 239 | 336 | 492/475 |
| Phe-Pro-Met-Lys-Thr | 639 (ox) | | 245 | 376 | 504 | 120 | 248 | 379 | 476 | |
| Trp-Tyr-Ser-His-Glu | 721 | | | | | | 285 | 372 | 535 | |
| Met-Phe-Gln-Gly-Ile | 595 | 132 | 279 | | 464/480 | 143 | 189 | 317 | 464 | |
| Phe-Leu-Ser-Val-Arg | 621 | 261 | | | | 175 | 274 | 361 | 474 | |
| Ile-Gly-Glu-Pro-His | 552 | 114 | 186 | 299 | 397 | 156 | 253 | 380 | 439 | 535 |
| Ala-Asn-Ile-Gly-Glu-Pro-His | 737 | | 186 | 299 | | | 439 | 552 | | 721 |

Tabelle 15. Fragmente der gemessenen Peptide

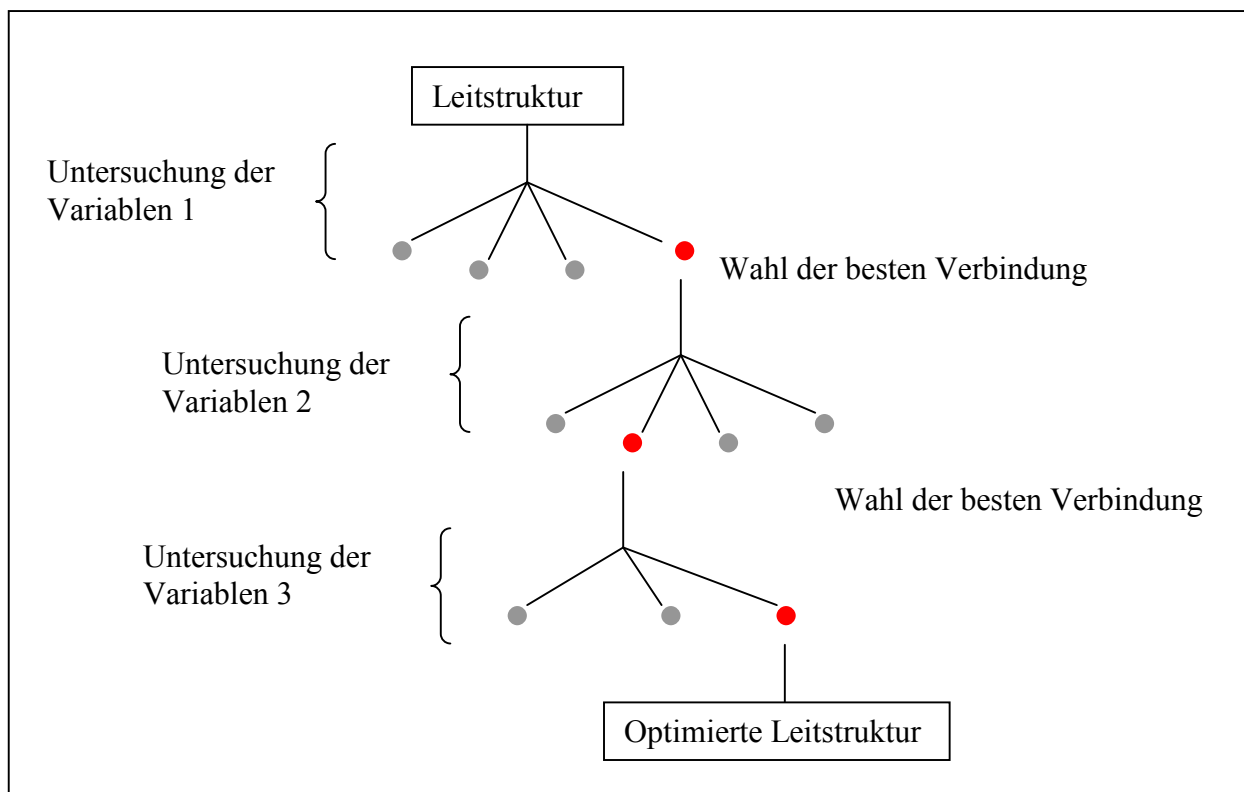
7. Synthese einer kombinatorischen Bibliothek zur Optimierung des Lamifiban-Grundgerüsts

Ein weiteres Ziel der Arbeit ist es, mittels einer Bibliothek bestehend aus peptidomimetischen Lamifiban-Variationen auf Festphase, zu zeigen, dass monoklonale Antikörper als „Screening-Tools“ für aktive Verbindungen verwendet werden können. Zu diesem Zweck wird Lamifiban, welches sich aus vier relativ einfachen Bausteinen („building blocks“) zusammensetzen lässt (**Figur 38**), mit mehreren verschiedenen Varianten (verschiedene Substituenten oder Derivate) pro Baustein variiert. Der erste Baustein besteht aus einer Säurefunktion, welche jedoch für die Kopplung ans Harz gebraucht wird und für eine Erkennung durch einen mAB in einem „on-bead-Assay“ nicht oder nur teilweise verfügbar ist. Der zweite Baustein ist ein unsubstituierter Piperidinyalkohol, ein ziemlich hydrophober Baustein, der Dritte ist eine natürliche Aminosäure, L-Tyrosin, und der vierte Baustein ist ein über eine Amidbindung gekoppeltes para-Benzamidin.



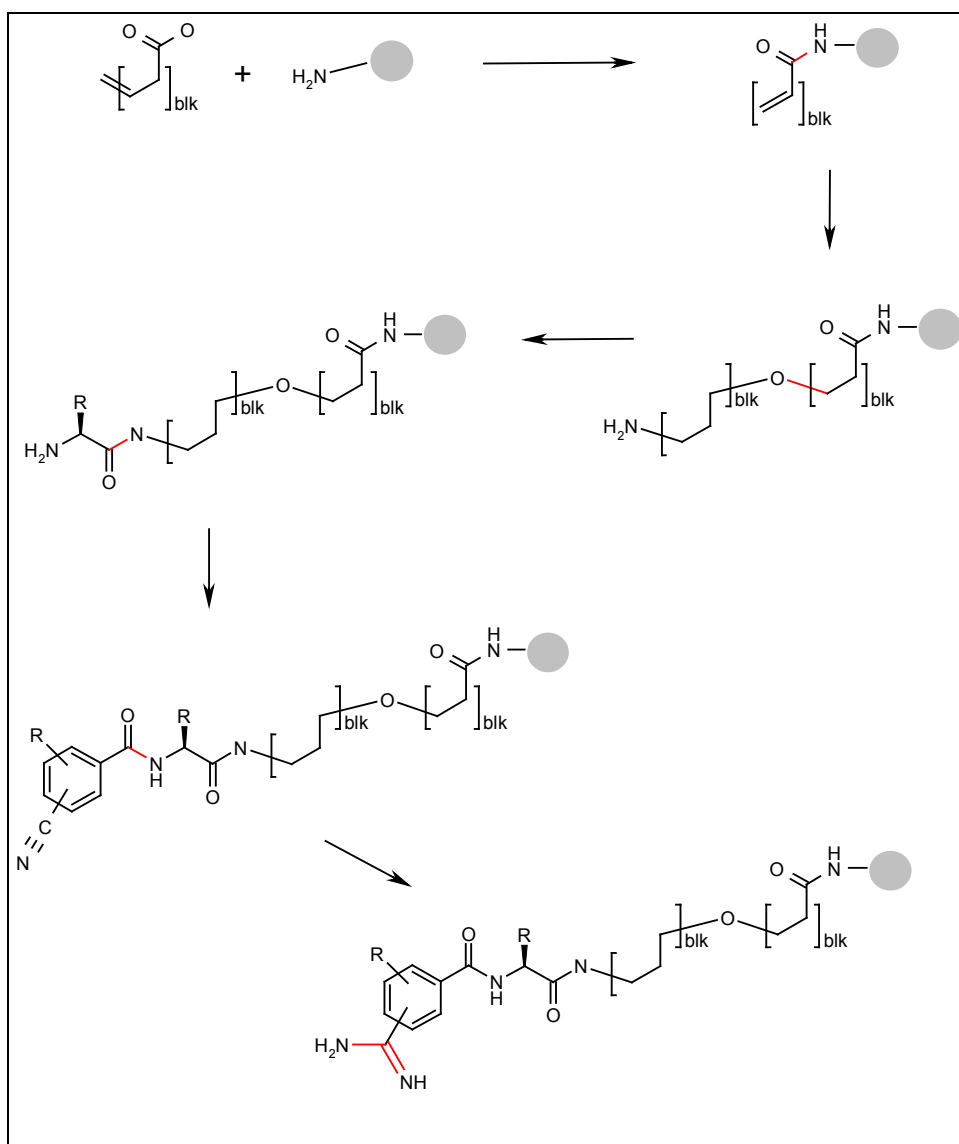
Figur 38. Lamifiban aufgeteilt in seine Bausteine

Die Variationen dieser vier Bausteine sollten ursprünglich wie bei der vorhergehenden Peptidchemie im Split&Mix-Verfahren durchgeführt und mit dem neu entwickelten Disulfidlinker analysiert werden. Da jedoch nach vollendeter Synthese einige Testversuche, die Substanzen auf den Beads zu analysieren, nicht erfolgreich waren, sei es wegen zu geringer Beladung oder zu schlechter Ionisierbarkeit, wurde eine andere Optimierungs-Strategie verfolgt; ein evolutionärer Ansatz mit schrittweiser Optimierung der einzelnen Bausteine. Dieser Ansatz, bei welchem der Einfluss jeweils einzelner Komponenten auf die Struktur als Ganzes untersucht wird (OVAT = one variable at a time) ¹³⁹, kann, wie verschiedentlich gezeigt wurde, erfolgreich sein, aber nur, wenn die Variablen vollkommen unabhängig voneinander sind (**Figur 39**).



Figur 39. Schematische Darstellung des OVAT („one variable at a time“) –Verfahrens ¹³⁹. Sequentiell werden Bibliotheken untersucht und jeweils mit einem optimierten Baustein in iterativer Weise weitergeführt.

Da die beiden funktionellen Gruppen an beiden Enden des Moleküls für die Aktivität am Rezeptor essentiell zu sein scheinen ^{140, 98}, wurde die Synthesestrategie am Harz so gewählt, dass wiederum eine Säurefunktion und eine Amidinfunktion vorhanden sind (**Schema 18**). Zu Beginn der Synthese wird daher eine Säure (Baustein 1) über eine Ester- oder Amidbindung ans Harz gekoppelt. Über eine michaelartige Addition an einen N-geschützten Aminoalkohol oder ein N-geschütztes Diamin (Baustein 2) erhält man die Etherbindung, wobei diese eine Methylengruppe länger ist als im Originalmolekül Lamifiban. Die Aminosäure (Baustein 3) wird peptidisch verknüpft. Daran wird dann wiederum peptidisch eine nitrilhaltige Säuregruppe (Baustein 4) gekoppelt. Das Nitril wird schliesslich zum Amidin reduziert, welches mittels verschiedener Derivatisierungen eine zusätzliche Variation der Struktur erlaubt.



Schema 18. Synthese eines Lamifiban-Analogum. Die neu entstandenen Bindungen sind rot markiert.

7.1 Evolutionäres Verfahren zur Optimierung eines Lamifibananaloga

Beim Screening der Peptidbibliotheken hat sich gezeigt, dass die Messung von einzelnen Beads zu nicht sehr zuverlässigen Resultaten führt. Die Wahrscheinlichkeit, ein falsch-positives Bead zu isolieren ist sehr gross. Bei der Evaluation des mAB-Tests hat sich gezeigt, dass eine statistische Auswertung bzw. ein Vergleich von verschiedenen Aliquoten Beads mit verschiedenen Verbindungen darauf ein genaueres und reproduzierbareres Resultat liefert. Zudem hat sich gezeigt, dass die MS-Analyse problematisch werden kann, bzw. dass eine „Single-Bead“-Analyse von nicht-peptidischen Verbindungen nicht mehr durchgeführt werden kann. Deshalb wurde ein effizienter Ersatz für die Suche von Lamifiban-Analogen mittels Split&Mix-Technik gesucht. Auf eine Split&Mix-Bibliothek mittels Tagging-Techniken wurde bewusst verzichtet, da eine derartige Anwendung wieder zu zeitaufwendigen Optimierungsschritten geführt hätte und da die Wahrscheinlichkeit von falsch positiven Beads in „one-bead-one-compound“-Bibliotheken, wie

oben erwähnt, beträchtlich ist. Als Alternative bot sich ein evolutionärer Ansatz für die Synthese und das Screening an. Bei diesem Ansatz wird das Gesamtmolekül in mehreren Schritten an verschiedenen Stellen des Moleküls jeweils mit verschiedenen Bausteinen variiert. In einem ersten Schritt wird beispielsweise die ganze Synthese mit Standard-Bausteinen bis zur vorletzten Stufe durchgeführt, die letzte Stufe wird dann mit mehreren Bausteinen in parallel-Arbeitsweise durchgeführt (**Figur 40**). Durch einen Screening-Schritt wird dann nach jeder Bibliotheksynthese die jeweils aktivste Variante des Bausteins eruiert und mit diesem ausgewählten Baustein wird dann die jeweils nächste Bibliothek synthetisiert. Eine Annahme, die man bei dieser Optimierung macht, ist die, dass ein aktives Molekül in einer linearen Art und Weise optimiert werden kann, d.h., dass wenn ein aktiver Baustein gefunden wird, dieser die Voraussetzung dafür ist, dass in einem weiteren Schritt die Aktivität weiter erhöht werden kann. Die Art der Erkennung am mAB und die Wechselwirkungen vom Molekül zum mAB sollten also immer an denselben Stellen stattfinden.

Der Ansatz dieses evolutionären Verfahrens bietet weitere Vor-, sowie Nachteile.

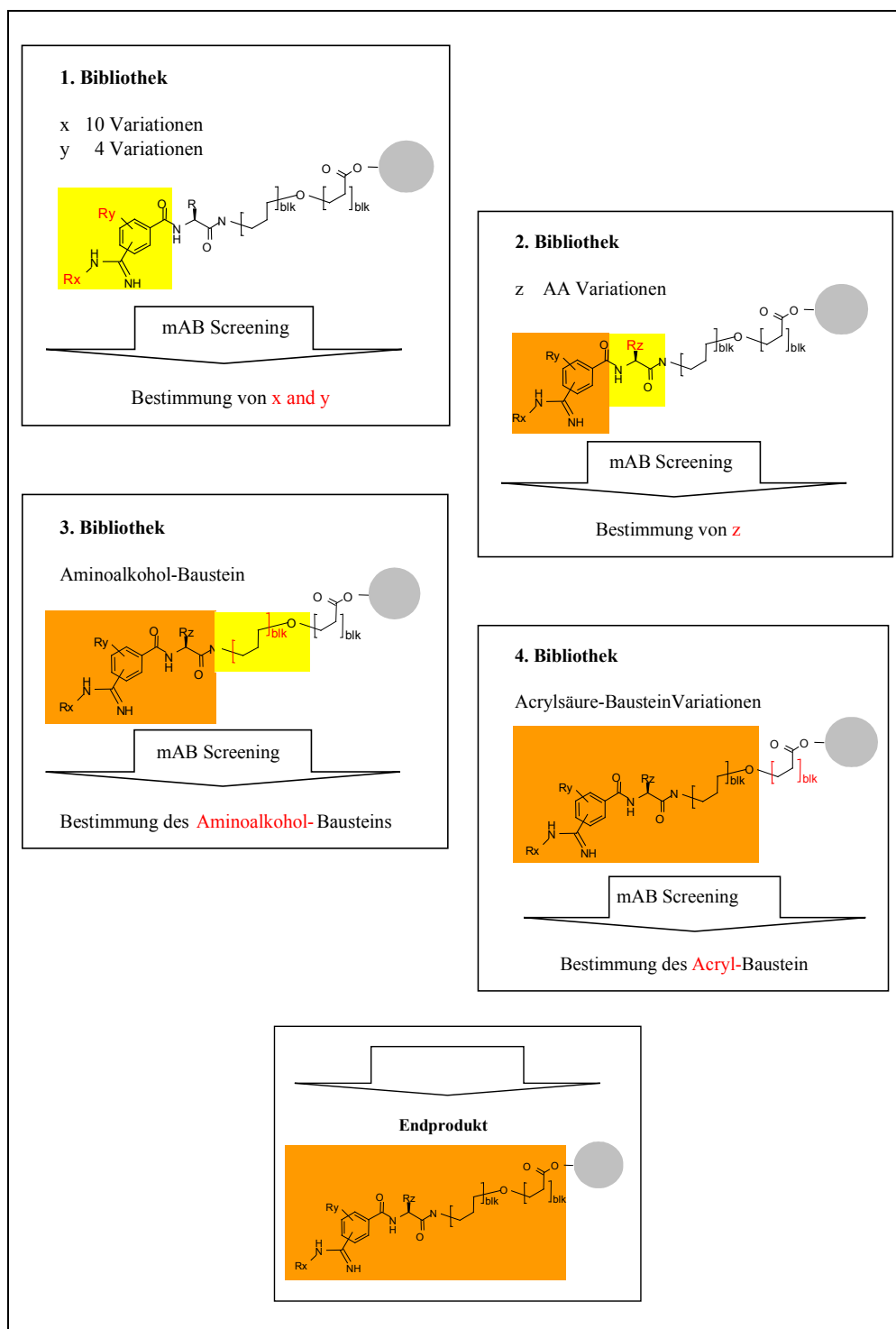
Die Vorteile sind:

- Keine Entwicklung einer passenden „Single-Bead“-Analytik mehr nötig.
- Keine Identifizierung der Substanzen auf den Beads nötig („Tagging“).
- Statistisches Erfassen der Aktivitäten mit mehreren Beads ergibt höhere Genauigkeit, keine falsch-positiven Resultate.
- Verfolgen beliebiger Reaktionsschritte mit IR möglich.

Die Nachteile sind:

- Die Diversität ist stark eingeschränkt.
- Höherer synthetischer Arbeitsaufwand.
- Höherer Aufwand für das Screening und die nachfolgende Auswertung.

Der Nachteil der eingeschränkten Diversität liesse sich insofern etwas minimieren, dass man nach erfolgter Optimierung aller Bausteine in iterativer Weise mit der Optimierung wieder von vorne anfängt, also mit einem optimierten Grundgerüst die einzelnen Bausteine erneut optimiert und auf ihre biologische Wirkung oder Affinität testet, was jedoch sehr zeitaufwendig ist.



Figur 40. Evolutionäres Verfahren zu einem optimierten Lamifibangerüst

7.2 Auswahl der „Building Blocks“

Die ausgewählten Bausteine für die Optimierungen der verschiedenen Stufen der Synthese sind in den untenstehenden Tabellen aufgeführt. Die Variation der Acrylbausteine, die in **Tabelle 16**

aufgeführt sind, ist insofern beschränkt, als nur wenige substituierte Acrylsäuren kommerziell erhältlich sind. Es wurden einige substituierte und cyclische Acrylsäuren eingesetzt. Die eingesetzten Aminoalkohole aus **Tabelle 17** werden vor dem Einsatz in der Michael-Addition am Amin mit Boc geschützt, da die Amingruppe in einer elektrophilen Addition bevorzugt reagieren würde.

In **Tabelle 18** sind alle eingesetzten natürlichen und unnatürlichen Aminosäuren aufgeführt. Dabei wurden nicht nur D- und L-Aminosäuren eingesetzt, sondern auch einige künstliche Aminosäuren. Die Variation der Nitrilbenzoesäuren **Tabelle 19** ist sehr eingeschränkt, da nur wenige kommerziell erhältlich sind. Jedoch konnte die Variation am Amidinende entscheidend vergrößert werden durch den Einsatz von verschiedenen Aminen (**Schema 30**), die in der verwendeten Reaktion zu verschiedenen substituierten Amidinen führen und in **Tabelle 20** aufgeführt sind



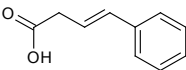
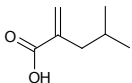
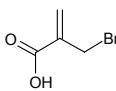
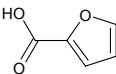
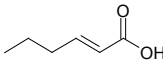
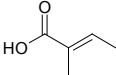
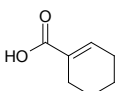
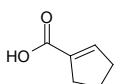
| Nr. | Verbindung | Struktur | Molgewicht |
|-----|----------------------------|---|------------|
| 1 | Acrylsäure |  | 72.0626 |
| 2 | Methacrylsäure |  | 86.089 |
| 3 | trans-Styrylessigsäure |  | 162.19 |
| 4 | Isobutylacrylsäure |  | 128.17 |
| 5 | 2-(Bromomethyl)-acrylsäure |  | 164.985 |
| 6 | 2-Furansäure |  | 112.0836 |
| 7 | 3-trans-Hexensäure |  | 114.15 |
| 8 | Tiglinsäure |  | 100.12 |
| 9 | 1-Cyclohexensäure |  | 126.15 |
| 10 | 1-Cyclopentensäure |  | 112.13 |

Tabelle 16. Eingesetzte Acryl-Bausteine (Baustein 1) in der kombinatorischen Synthese einer Lamifiban-Optimierungs-Bibliothek

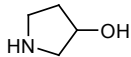
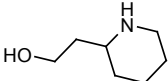
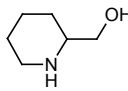
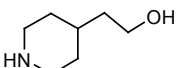
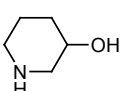
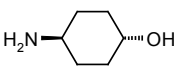
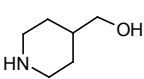
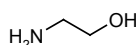
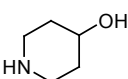
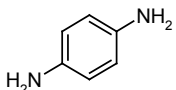
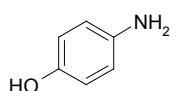
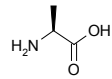
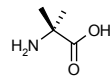
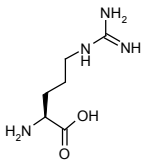
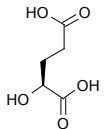
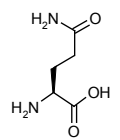
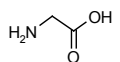
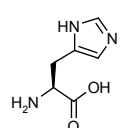
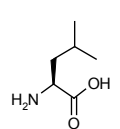
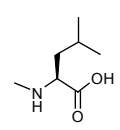
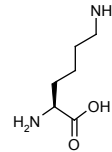
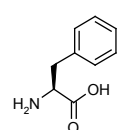
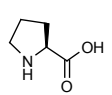
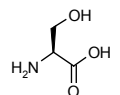
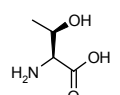
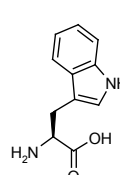
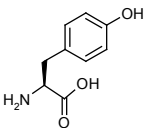
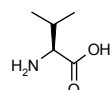
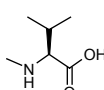
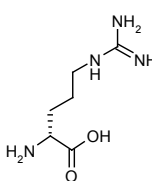
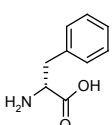
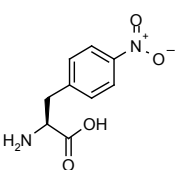
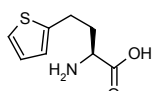
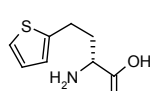
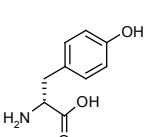
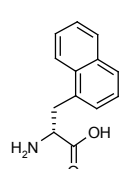
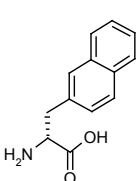
| Nr. | Verbindung | Struktur | Molgewicht | N-Boc geschützt |
|---|---------------------------|---|------------|-----------------|
| 1 | 3-Pyrrolidinol |  | 87.12 | 115 |
| 2 | 2-Piperidylethanol |  | 129.2 | 116 |
| 3 | 2-Piperidylmethanol |  | 115.17 | 117 |
| 4 | 4-Piperidylethanol |  | 129.2 | 118 |
| 5 | 3-Hydroxypiperidin |  | 101.14 | 119 |
| 6 | Trans-4-aminocyclohexanol |  | 115.18 | 120 |
| 7 | 4-Piperidylmethanol |  | 115.17 | 121 |
| 8 | 2-Aminoethanol |  | 61.08 | a) |
| 9 | 4-Hydroxypiperidine |  | 101.15 | a) |
| 10 | 1,4-Phenyldiamin |  | 108.14 | b) |
| 11 | 4-Hydroxyanilin |  | 109.13 | 122 |
| a) die Substanz ist N-Boc geschützt kommerziell erhältlich b) die Substanz musste vor dem Einsatz nicht geschützt werden | | | | |

Tabelle 17. Eingesetzte Aminoalkoholbausteine / Diamin (Baustein 2) in der kombinatorischen Synthese einer Lamifiban-Optimierungs-Bibliothek. Alle Aminoalkohole waren N-Boc geschützt.

| Nr. | Aminosäure | Struktur | Molgewicht |
|-----|--------------|---|------------|
| 1 | L-Ala |  | 89.09 |
| 2 | C-Methyl-Ala |  | 103.12 |

| | | | |
|----|----------------|---|--------|
| 3 | L-Arg |  | 174.20 |
| 4 | L-Glu |  | 148.12 |
| 5 | L-Gln |  | 146.15 |
| 6 | L-Gly |  | 75.05 |
| 7 | L-His |  | 155.16 |
| 8 | L-Leu |  | 131.18 |
| 9 | N-Methyl-L-Leu |  | 145.20 |
| 10 | L-Lys |  | 146.19 |
| 12 | L-Phe |  | 165.19 |
| 13 | L-Pro |  | 115.13 |
| 14 | L-Ser |  | 105.09 |
| 15 | L-Thr |  | 119.12 |
| 16 | L-Trp |  | 204.23 |

| | | | |
|----|----------------|---|--------|
| 17 | L-Tyr |  | 181.19 |
| 19 | L-Val |  | 117.15 |
| 20 | N-Methyl-L-Val |  | 131.18 |
| 21 | D-Arg |  | 174.20 |
| 22 | D-Phe |  | 165.19 |
| 23 | p-Nitro-L-Phe |  | 210.19 |
| 24 | L-2-Thienylala |  | 185.25 |
| 25 | D-2-Thienylala |  | 185.25 |
| 26 | D-Tyr |  | 181.19 |
| 27 | D-1-Naphtylala |  | 215.25 |
| 28 | D-2-Naphtylala |  | 215.25 |

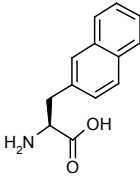
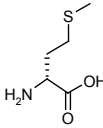
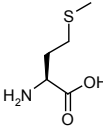
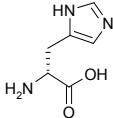
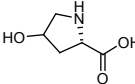
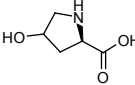
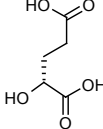
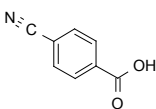
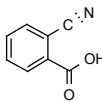
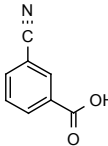
| | | | |
|----|----------------|---|--------|
| 29 | L-2-Naphtylala |  | 215.25 |
| 30 | D-Met |  | 149.21 |
| 31 | L-Met |  | 149.21 |
| 32 | D-His |  | 155.16 |
| 33 | L-Hyp |  | 131.13 |
| 34 | D-Hyp |  | 131.13 |
| 35 | D-Glu |  | 148.12 |

Tabelle 18. Eingesetzte natürliche, unnatürliche und künstliche Aminosäuren (Baustein 3) für die kombinatorische Lamifiban-Optimierungs-Bibliothek.

| Nr. | Verbindung | Struktur | Molmasse |
|-----|--------------------|---|----------|
| 1 | 4-Cyanobenzoesäure |  | 147.13 |
| 2 | 2-Cyanobenzoesäure |  | 147.13 |
| 3 | 3-Cyanobenzoesäure |  | 147.13 |

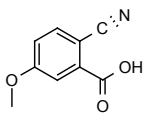
| | | | |
|---|------------------------------|---|--------|
| 4 | 2-Cyano-5-Methoxybenzoesäure |  | 177.16 |
|---|------------------------------|---|--------|

Tabelle 19. Eingesetzte Cyanobenzoesäuren (Baustein 4) für die kombinatorische Synthese der Lamifiban-Optimierungs-Bibliothek.






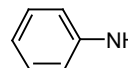
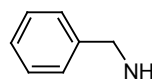
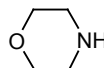
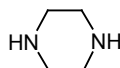
| Nr. | Amin | Struktur | Molgewicht |
|-----|-----------------|---|------------|
| 1 | Ammoniak | NH_3 | 17.03 |
| 2 | Methylamin |  | 31.06 |
| 3 | Dimethylamin |  | 45.08 |
| 4 | Ethylamin |  | 45.08 |
| 5 | Ethylmethylamin |  | 59.11 |
| 6 | Piperidin |  | 85.15 |
| 7 | Anilin |  | 93.13 |
| 8 | Benzylamin |  | 107.16 |
| 9 | Morpholin |  | 87.12 |
| 10 | Piperazin |  | 86.14 |

Tabelle 20. Die eingesetzten Amine zur Derivatisierung des Amidinbausteins

Die Substanzen sind so gewählt, dass der grundlegende Aufbau des Lamifiban-Gerüsts gleich bleibt, nur die Bausteine und deren Substitutionsmuster werden verändert. Es werden z.B. zusätzliche Substituenten am Acrylsäurebaustein (Baustein 1), verschiedene Substitutionsmuster an Pyrrolidin- und Piperidinringen als Aminoalkohole (Baustein 2) und verschieden substituierte Benzoesäuren (Baustein 4) eingeführt. Die Aminosäure (Baustein 3) wird durch den Einsatz von D- und L-Aminosäuren und wenigen künstlichen Aminosäuren variiert.

7.3 Evaluation und Optimierung der Synthesesequenz

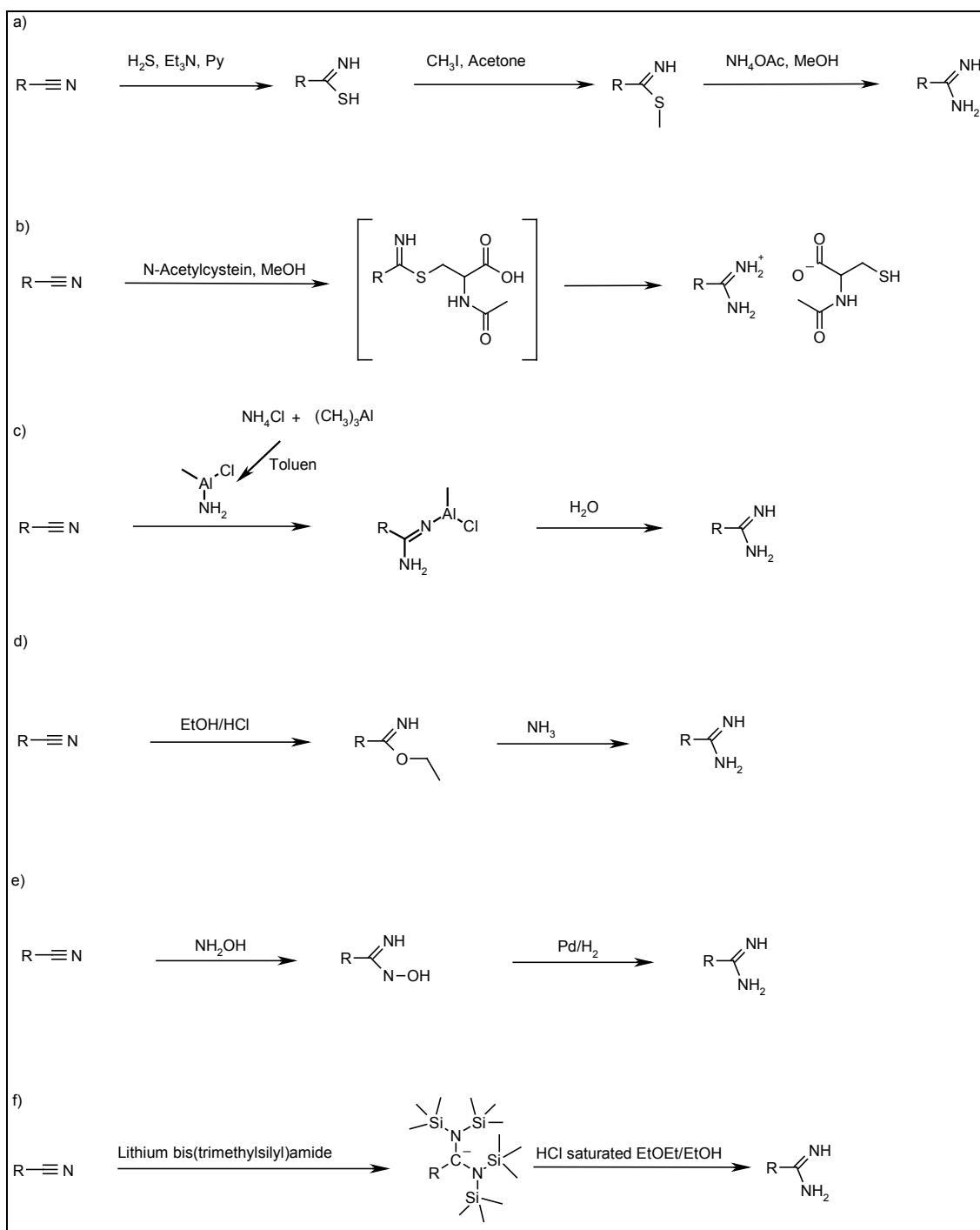
Bevor überhaupt eine Bibliothek synthetisiert wird, sollten die voraussichtlich chemisch problematischen Reaktionen direkt auf dem Harz durchgeführt und optimiert werden. Zu diesen gehören die Michael-Addition und die Reduktion des Nitrils zum Amidin, wobei beide Reaktionen direkt auf dem Harz in der Literatur noch nicht beschrieben worden sind. Eine Hauptschwierigkeit besteht darin, dass die Reaktionsbedingungen nicht zu basisch/nucleophil sein dürfen, da sonst der Disulfidlinker an den Esterbindungen angegriffen wird. Als besonders heikel wurde die Amidinbildung angesehen, da bisher nur Reaktionen in stark basischem Milieu bekannt sind. Deshalb wurde diese Reaktion als Erste in Angriff genommen.

7.3.1 Reduktion vom Nitril zum Amidin

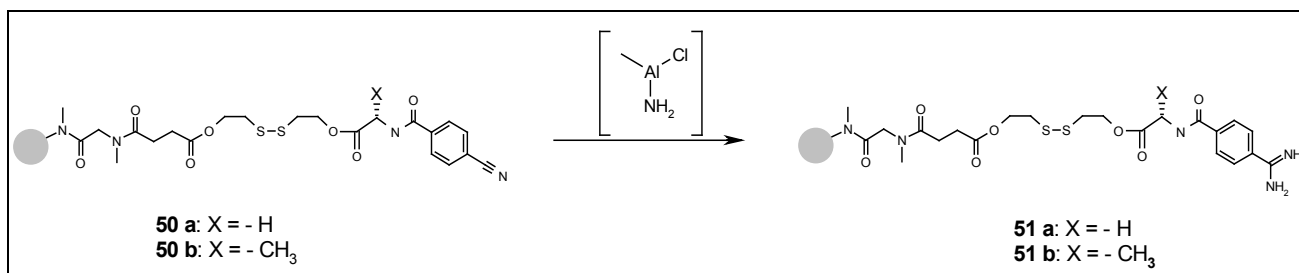
Zu den gebräuchlichen Reduktionsmethoden (**Schema 19**) für Nitrile zu Amidinen gehören a) die dreistufige Methode über ein Thioamidit, b) eine neue Variante der Thioamiditmethode ¹⁴¹, c) die Weinreb-Methode mittels Aluminiumamiden, die ursprünglich zur Umsetzung von Estern zu Amidinen entwickelt wurde ^{142, 143}, d) die Pinner-Methode ¹⁴⁴, e) die katalytische Reduktion eines zuerst gebildeten Hydroxyamidins und f) die Reaktion mit Trimethylsilylamid und darauffolgender Hydrolyse ^{145, 146}.

Da die Synthese am Harz mit einem S-S-Linker (der ja basen-labil ist) durchgeführt werden soll, kann Methode a) nicht angewendet werden wegen der Reduktionsgefahr durch H₂S. Auch die Methode e) kann nicht verwendet werden, da Hydroxylamin zu stark basisch ist und die Esterbindungen des Linkers sofort spalten würde. Die Methode f) wurde mit verschiedenen Konzentrationen an Silylamid durchgeführt, keine der Reaktionen ergab aber eine beobachtbare Umsetzung zum Intermediat, deshalb wurde sie nicht weiterverfolgt. Die Reaktionen c) und d) sahen am erfolgversprechendsten aus und wurden deshalb näher untersucht.

Die Reduktion c) sollte vorerst mit einer für Synthesen in Lösung beschriebenen Synthese mit Aluminiumamid (**Schema 20**) durchgeführt werden. Das am Harz gebundene Nitril (**50**) wird mit einer „in-situ“ unter Trockeneiskühlung hergestellten Lösung aus NH₄Cl und Al(CH₃)₃ zum Amidin (**51**) umgesetzt.

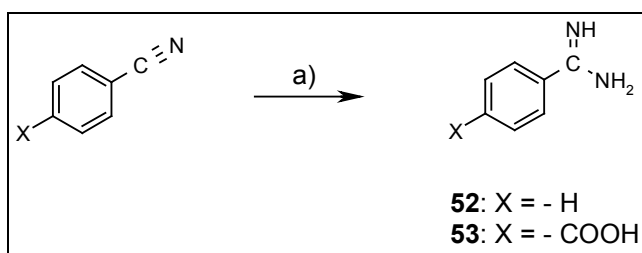


Schema 19. Verschiedene Methoden zur Reduktion von Nitrilen zu Amidinen



Schema 20. Reduktion des am Harz gebundenen Nitrils zum Amidin. Reaktionsbedingungen: i) Toluol, 5°C, NH₄Cl, Al(CH₃)₃-Lösung; ii) 2 h, RT

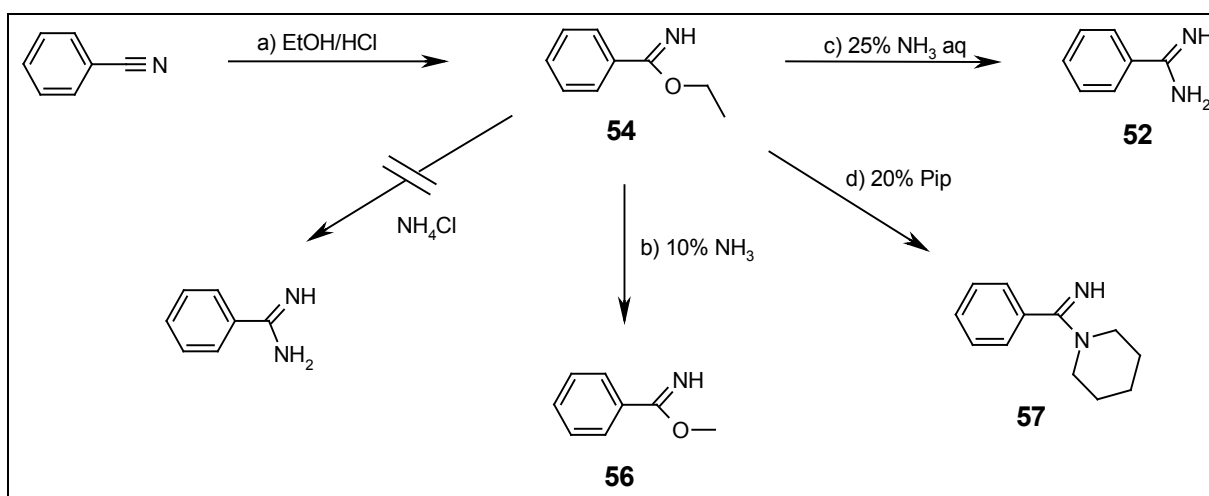
Erste Versuche, die Reaktion direkt am Harz durchzuführen, waren nicht erfolgreich, die Analyse mit ATR-IR zeigen zwar keine Nitrilgruppe mehr bei 2200 cm⁻¹, jedoch fehlt auch die charakteristische Esterbande bei 1720 cm⁻¹. Wahrscheinlich sind die angegebenen Reaktionsbedingungen, 16 h bei 80° C, für Synthesen am Harz, insbesondere mit dem S-S-Linker nicht geeignet und der Linker oder die Estergruppen werden gespalten. Ein weiterer Versuch bei RT sieht laut ATR-IR-Spektrum erfolgsversprechender aus. Die Reaktion wurde erst im nMol-Massstab auf einem kleinen Aliquot Harz durchgeführt. Um die Effizienz der Reduktion von Nitril zum Amidin zu bestimmen, wurde eine kurze Sequenz PEGA - Sarcosin - SS-Linker - Glycin - (p-Cyanobenzoesäure) **50 a** hergestellt und unter den obigen Bedingungen umgesetzt. Nach Abspaltung mit 25 % Ammoniaklösung konnte aber kein Produkt gefunden werden. Deshalb wurde die Reaktion probeweise in Lösung durchgeführt (**Schema 21**). Zuerst mit p-Cyanobenzoesäure, danach mit Benzonitril, aber unter den gegebenen Bedingungen war nach Aufarbeitung (und Chromatographie) im HPLC und MS kein Produkt sichtbar. Da Trimethylaluminium sehr leicht flüchtig ist, wurde bei einem weiteren Versuch ein Trockeneiskühler eingesetzt, um das Aluminiumamid „in situ“ herzustellen, wobei diesmal bei der Reduktion von Benzonitril eine Ausbeute von ca. 70 % erreicht wurde.



Schema 21. Reduktion von Benzonitril und 4-Nitrilbenzoesäure zum entsprechenden Benzamidin

Mit derselben Lösung wurde auch wieder ein am Harz gebundenes Nitril umgesetzt, laut MS (nach Abspaltung) und MAS-NMR eines Harzaliquotes ist jedoch keine Reaktion abgelaufen. Ein Problem bei dieser Reaktion stellt wahrscheinlich die Hydrolyse des Aluminiumamid-Intermediates dar, die am Harz nicht über Silicagel erfolgen kann. Auf dem Harz bildet sich während der Reaktion ein schwerlösliches Produkt oder ein Niederschlag, welcher sich nur durch Behandlung mit Essigsäure wieder löst. Nachdem diese präparativen Schwierigkeiten nicht gelöst werden konnten, wurde dieser Ansatz für eine Festphasenadaption nicht weiter verfolgt.

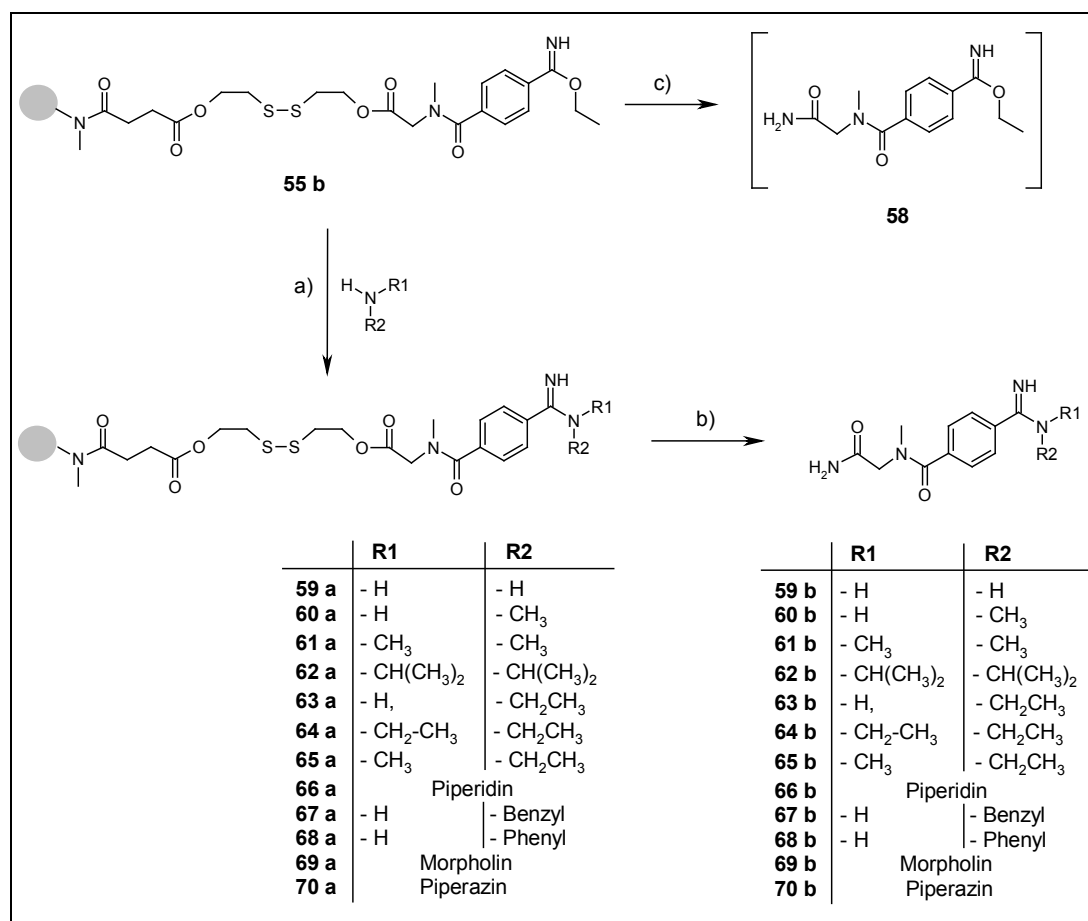
Die Reaktion d) wurde zuerst anhand von Nitrilbenzoesäure in Lösung durchgeführt, wobei der erste Schritt, die Addition des Ethanols zum Oxoamidit **54** quantitativ erfolgte (DC, HPLC), und die nukleophile Substitution durch Ammoniak zum unsubstituierten Amidin **52** oder mit Piperidin zum substituierten Amidin **57** in guter Ausbeute erfolgte (Schema 22). Leider konnte keine Methode gefunden werden, den zweiten Schritt unter nicht basischen Bedingungen durchzuführen. Wird NH_3 -Lösung in niedriger Konzentration in MeOH verwendet, wird auf Festphase einerseits der Linker gespalten, andererseits erhält man eine Umlagerung zum Methoxoamidit **56**, mit NH_4Cl ¹⁴⁴ erhält man keine Reaktion.



Schema 22. Reaktion des Oxoamidit-Intermediates zu diversen Endprodukten

Da das gewünschte unsubstituierte Amidin unter nicht-basischen Bedingungen auf dem Harz nicht hergestellt werden konnte, das Intermediat aber sehr gut zum Piperidylamidin reagierte, wurde immerhin untersucht, wie das Intermediat mit verschiedenen 1° und 2° Aminen reagiert. Dazu wurde eine Ausgangsverbindung PEGA-Sarcosin-Linker-Sarcosin-p-Nitrilbenzoesäure (**50 b**) zuerst zum Oxoamidit-Intermediat umgesetzt und danach Aliquote des Harzes unter verschiedenen Bedingungen mit verschiedenen Aminen zu den substituierten Amidinen umgesetzt.

Die Produkte wurden mit 25 % NH_4OH -Lösung vom Harz abgespalten, mittels MS analysiert und per HPLC quantifiziert (Schema 23).



Schema 23. Prozedur zur Evaluation der optimalen Reaktionsbedingungen: a) RT; b) ca. 30 mg Harz, 25 % NH₄OH, 10 Min, RT c) 25 % NH₄OH, 10 Min, RT

Die Resultate der verschiedenen untersuchten Amine und der Reaktionsbedingungen sind in **Tabelle 21** dargestellt. Die Reaktionen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Amin bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktionsgemische wurden qualitativ mittels MS und quantitativ mittels HPLC analysiert, wobei die HPLC-Peaks gesammelt und durch MS-Analyse dem jeweiligen Produkt zugeordnet wurden.

| Eingesetztes Amin | pK _a -Werte | Bedingungen für die Substitution | MS (M+H) ⁺ / HPLC | Bemerkungen |
|----------------------------------|------------------------|--|------------------------------|--|
| Ammoniak → 59 a | 9.25 | 1 %, 5 %, 10 %, 25 % aq. | 59 b: no | Linkerspaltung ist bei allen Konzentrationen die bevorzugte Reaktion und schneller als Amidinbildung |
| Methylamin → 60 a | 10.63 | 20 % Methylamin in EtOH, 20 h | 60 b: 249 / ~50% | Nur schwache Reaktion, der Linker wird gespalten |
| Dimethylamin → 61 a | 10.68 | 20 % Dimethylamin in ETOH, 20 h | 61 b: 263 | fast vollständige Reaktion, Linker bleibt stabil |
| Diisopropylamin → 62 a | ~11.2 | 10 %, 25 % und 100 % Diethylamin in EtOH, 20 h | 62 b: no | Bei allen Konzentrationen keine Reaktion, Linker bei 100% nicht mehr stabil |

| | | | | |
|---|--------|--|---|---|
| Ethylamin → 63 a | 10.7 | 20 % Ethylamin in EtOH, 20 h 50 % Ethylamin in EtOH, 3 Tage | 63 b: 263 / ~40 % no | Nur schwache Reaktion, Linker stabil, Edukt noch sichtbar Linker nicht mehr stabil, weder Edukt noch Produkt |
| Diethylamin → 64 a | 11.02 | 10 % und 100 % Diethylamin in EtOH, 20 h 50 % Diethylamin in EtOH, 3 Tage | 64 b: no no | Bei allen Konzentrationen keine Reaktion, Linker bei 100 % nicht mehr stabil keine Reaktion, nur Edukt, Beladung hat abgenommen, Linker wird gespalten |
| Ethylmethylamin → 65 a | ~10.7 | 20 % Ethylmethylamin in EtOH, 20 h 50 % Ethylmethylamin in EtOH, 20 h | 65 b: 277 / ~50 % 277 / ~80 % | Linker stabil, Edukt noch sichtbar Fast vollständige Reaktion, Linker stabil, Edukt noch sichtbar |
| Piperidin → 66 a | 11.123 | 5 %, 10 % und 20 % Pip. in EtOH, 5 h 5 %, 1 % und 20 % Pip. in MeOH, 5 h 5 %, 10 % und 20 % Pip. in ACN, 5 h 5 %, 10 % und 20 % Pip. in MeChlo, 5 h 50 % Pip. in EtOH, 3 h | 66 b: 302 302 302 no no | Linker stabil, Edukt noch sichtbar Linker stabil, Edukt noch sichtbar Linker stabil, Edukt noch sichtbar keine Reaktion nur Edukt Spuren von Edukt und Produkt, Linker wird gespalten |
| Anilin → 67 a | 4.63 | 10 % Anilin in Ethanol, 20 h | 67 b: 311 / 60 % | Linker stabil, Edukt noch sichtbar |
| Benzylamin → 68 a | 9.33 | 10 % Benzylamin in Ethanol, 20 h | 68 b: 325 / 100 % | Fast vollständige Reaktion, Linker stabil, Edukt noch sichtbar |
| Morpholin → 69 a | 8.33 | 5 % und 20 % Morpholin in EtOH 50 % Morpholin in EtOH, 3 Tage | 69 b: 305 / 40 % 305 / 50 % | Linker stabil, Konz. hat keinen Einfluss auf Ausbeute Linker stabil, Konz. hat keinen Einfluss auf Ausbeute |
| Piperazin → 70 a | 9.83 | 5 % und 20 % Piperazin in EtOH 50 % Piperazin in EtOH, 3 Tage | 70 b: 304 / 40 % no | Linker stabil, Konz. hat keinen Einfluss auf Ausbeute kein Edukt und Produkt, Linker instabil |

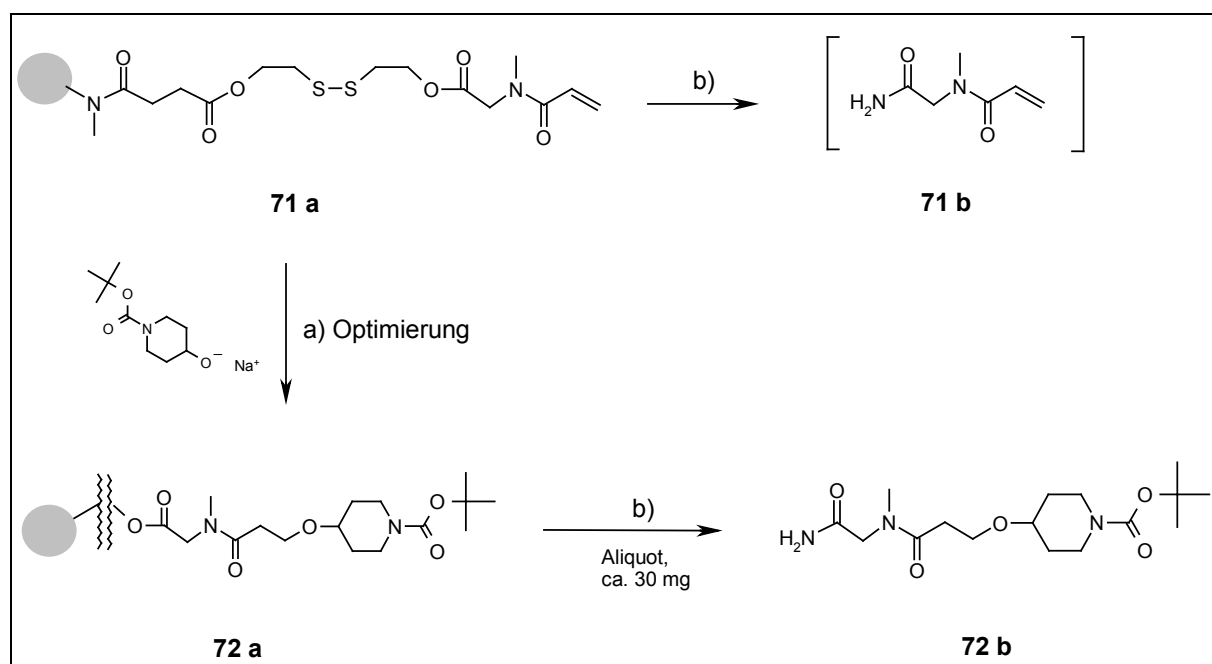
Tabelle 21. Zusammenstellung der Resultate für die Synthese zu den substituierten Amidinen. Die rot gefärbten Amine mit den entsprechenden Reaktionsbedingungen werden für die Synthese einer Bibliothek unter Anwendung des Disulfidlinkers als geeignet erachtet.

Die Ausbeuten der jeweiligen Reaktionen sind nicht so hoch wie erhofft, für die gewünschte Anwendung eines Fluoreszenzassays sollte die Menge an Produkt jedoch genügen. Die rot angefärbten Amine werden wegen ihrer Ausbeute als geeignet erachtet, um in einer Bibliothek eingesetzt zu werden. Ein gut bindendes Molekül („good binder“), das vielleicht um einen Faktor 10^2 bis 10^3 besser bindet als andere, sollte in dem Fluoreszenzassay auch viel stärker leuchten, wenn die Beladung etwas niedriger ist. Für die MS-Analyse könnte die Tatsache, dass das Oxoamidit-Intermediat nicht ganz zum substituierten Amidin abreagiert, sogar hilfreich sein, da die eventuell auftretenden Massendifferenzen gleich dem jeweils eingesetzten Amin zugeordnet werden können.

7.3.2 Michael-Addition (nucleophile Addition eines Alkoholats an Acrylsäure)

7.3.2.1 Optimierung der Michael-Addition auf dem Harz

Um die optimalen Reaktionsbedingungen für die Michael-Reaktion zu evaluieren, wurde wiederum eine Ausgangssequenz, diesmal PEGA-Harz – Sarcosin – SS-Linker – Sarcosin – Acrylsäure **71 a** hergestellt (**Schema 24**). Aliquote dieses Harzes wurden unter verschiedenen Reaktionsbedingungen umgesetzt und das Produkt abgespalten und mit MS analysiert (**Schema 24**).



Schema 24. Prozedur zur Evaluation der besten Reaktionsbedingungen für die Michael-Addition; a) Optimierung unter verschiedenen basischen Bedingungen, b) 25 % NH_4OH , 10 Min, RT

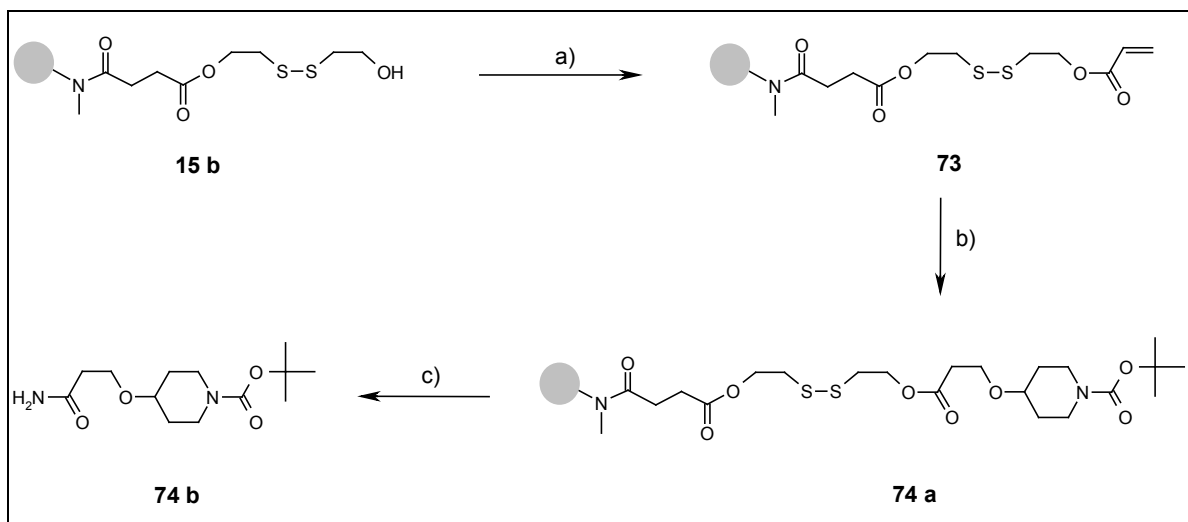
Die bisher beschriebenen Reaktionen dieser Art beschränken sich auf Synthesen in Lösung, wobei diese aber hauptsächlich heterogen katalysiert reagieren^{147, 148} oder mit starken Basen wie KOH/NaOH ¹⁴⁹ oder Triton B und BuLi ¹⁵⁰ sowie NaH ¹⁵¹ umgesetzt werden. Da in der Literatur jedoch noch keine ähnliche Reaktion für die Festphase beschrieben ist, wurde die Reaktion zuerst mit einer schwachen Base wie Pyridin in verschiedenen LM durchgeführt, wie es für michaelartige Additionen an Amine beschrieben ist^{152, 153} (**Tabelle 22**). Für die Deprotonierung der Alkohole scheint Pyridin aber zu schwach basisch zu sein ($\text{pK}_\text{B} = 8.7$) und es wurden weitere Versuche mit NaH und DBU in trockenen aprotischen LM wie DMF und THF durchgeführt. Mittels HPLC wurde versucht, die basisch abgespalteten Reaktionsprodukte zu analysieren, was aber nicht funktionierte, weil einerseits die Konzentrationen der Spatlösungen zu gering waren, andererseits weil die Verbindungen nicht UV-aktiv sind. Deshalb konnten die abgespalteten Produkte nur mit MS analysiert werden. Diese Reaktion wurde somit nur qualitativ optimiert, die Güte der Reaktion ist nicht bekannt.

| Bedingungen | MS | Bemerkungen |
|---|--------------------------|-------------------------------|
| 10% Lsg. in NMP, 10% Py, 10% DIPEA, 20 h | a) | keine Reaktion, Linker stabil |
| 10% Lsg in H ₂ O, 10% Py, 10% DIPEA, 20 h | a) | |
| 10% Lsg. in CH ₂ Cl ₂ , 10% Py, 10% DIPEA, 20 h | a) | |
| 10% Lsg. in Py, 10% DIPEA, 20 h | a) | |
| 1 equ. Harz/Edukt, 5 equ. Aminoalkohol, 1 equ. NaH in DMF, 4 h und 20 h | a) | keine Reaktion, Linker stabil |
| 1 equ. Harz/Edukt, 5 equ. Aminoalkohol, 10 equ. NaH in DMF, 4 h und 20 h | a) | |
| 1 equ. Harz/Edukt, 5 equ. Aminoalkohol, 100 equ. NaH in DMF, 4 h und 20 h | a) | |
| 10 µMol Harz/Edukt, 3 µMol NaH-Lsg. in THF, 0.3 equ. | a) | keine Reaktion, Linker stabil |
| 10 µMol Harz/Edukt, 30 µMol NaH-Lsg. in THF, 3 equ. | a) | |
| 10 µMol Harz/Edukt, 300 µMol NaH-Lsg. in THF, 30 equ. | [M-H] ⁺ = 343 | Linker stabil |
| 10 µMol Harz/Edukt, 1% DBU in DMF | a) | keine Reaktion |
| 10 µMol Harz/Edukt, 10% DBU in DMF | a) | |
| 10 µMol Harz/Edukt, 100% DBU | a) | |
| a) kein Molpeak im MS sichtbar | | |

Tabelle 22. Bedingungen für die Michael-Addition am Harz. Die Produkte wurden mit 25 % NH₄OH-Lösung abgespalten und die Spaltlösungen im ISP-MS analysiert.

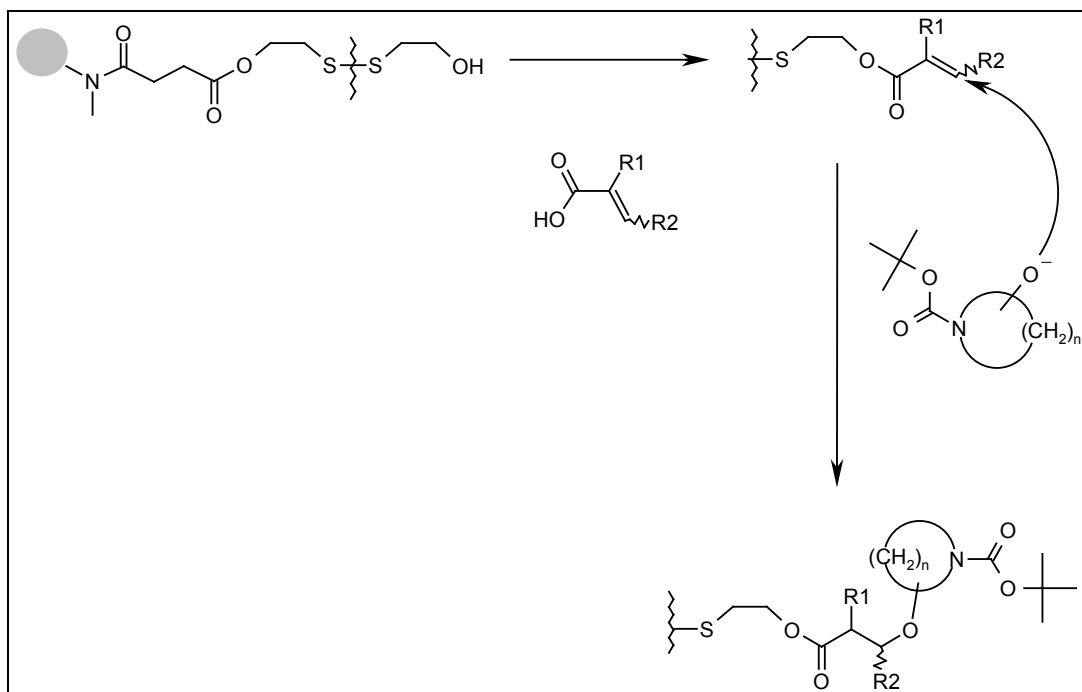
Ausser der rot eingefärbten Reaktionsbedingung, bei der 30 Äquivalente an NaH eingesetzt wurden, ergab keine Reaktion eine im MS beobachtbare Umsetzung. Auch NaH in trockenem DMF ergab keine Reaktion. Nur mit NaH in THF war eine relativ saubere Reaktion zu beobachten, welche sich auch mehrere Male reproduzieren liess.

Um eine weitere Absicherung vorzunehmen, wurde die folgende Reaktionssequenz, die Anfangssequenz einer kombinatorischen Bibliothek (**Schema 25**) in kleinem Masstab durchgeführt und mittels MS analysiert. Die Reaktion ist unter den gegebenen Bedingungen reproduzierbar.




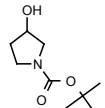
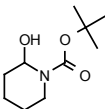
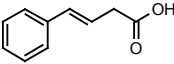
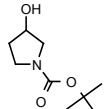
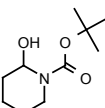

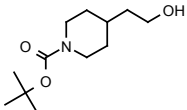
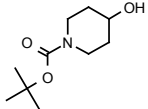
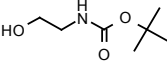

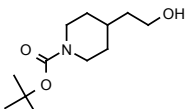
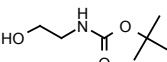

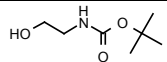
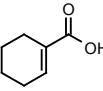
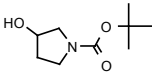
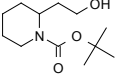
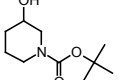
Schema 25. Anfangssequenz der kombinatorischen Bibliothek. Kopplung unsubstituierter Acrylsäure und Addition eines N-Boc geschützten Aminoalkohols gefolgt von hydrolytischer Abspaltung: a) DCC, DMAP (kat.), Pyridin, CH_2Cl_2 , RT; b) NaH, THF, RT; c) 25 % NH_4OH -Lösung.

Um die ausgewählten Acrylsäurebausteine und N-Boc geschützten Aminoalkoholbausteine zu testen, wurde die bisher nur für eine Einzelverbindung optimierte Reaktion nun mit mehreren verschiedenen Verbindungen und Kombinationen durchgeführt (**Schema 26**).



Schema 26. Allgemeine Darstellung der ersten beiden Reaktionsschritte. Eine substituierte Acrylsäure über eine Esterbrücke an den Disulfidlinker gekoppelt, danach addiert ein Hydroxy-Anion an die Doppelbindung des Acrylesters auf der Festphase.

Die Reaktion wurde in THF mit 30 Äquivalenten NaH im Verhältnis zum Acrylester am Harz durchgeführt. Jedoch zeigte sich, dass die für die Reaktion **73** → **74 a** erprobten Reaktionsbedingungen für einige dieser Verbindungen ungeeignet sind (**Tabelle 23**).

| Acrylsäurebaustein | N-Boc-Aminoalkoholbaustein | MS und ATR-IR |
|---|---|--|
|  |  | a), b) |
| |  | a), b) |
|  |  | a), b) |
| |  | a), b) |
|  |  | [M-H] = 301 75 a → 75 b |
| |  | [M-H] = 272 74 a → 74 b |
| |  | a) |
|  |  | a) |
| |  | a) |
|  |  | a) |
|  |  | a), b) |
| |  | a), b) |
| |  | a), b) |


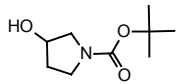
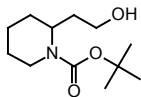
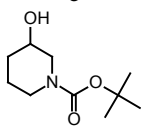
| | | |
|---|---|--------|
|  |  | a), b) |
| |  | a), b) |
| |  | a), b) |
| a) Konzentration der Spalllösung zu klein / keine beobachtbare Reaktion b) IR-Spektren nicht interpretierbar / kein Umsatz festzustellen | | |

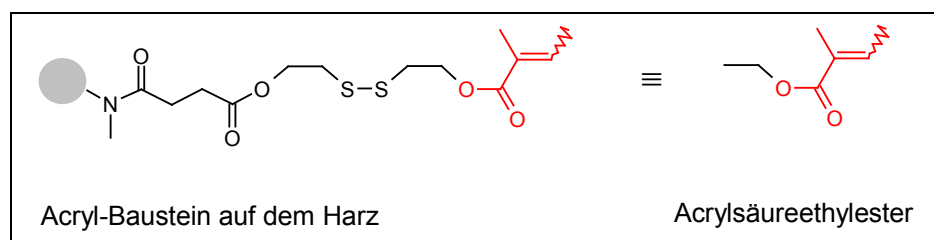
Tabelle 23. Bisher benutzte Reaktanden für die ersten beiden Schritte

Wie aus den bisherigen Resultaten in **Tabelle 23** hervorgeht, funktioniert die Michael-Reaktion unter den gewählten Bedingungen nur bei der unsubstituierten Acrylsäure. Mit entweder α - oder β -substituierten Acrylsäuren oder α - und β -bisubstituierten Acrylsäuren funktioniert die Reaktion unter diesen Bedingungen nicht und es konnte im MS und im IR kein Produkt nachgewiesen werden. Die Substitution der Aminoalkohole scheint dabei keine Rolle zu spielen, da die Reaktion mit Acrylsäure und einem 1° (**75 a**) sowie einem 2° Alkohol (**74 a**) abläuft.

7.3.2.2 Optimierung der Michael-Addition in Lösung

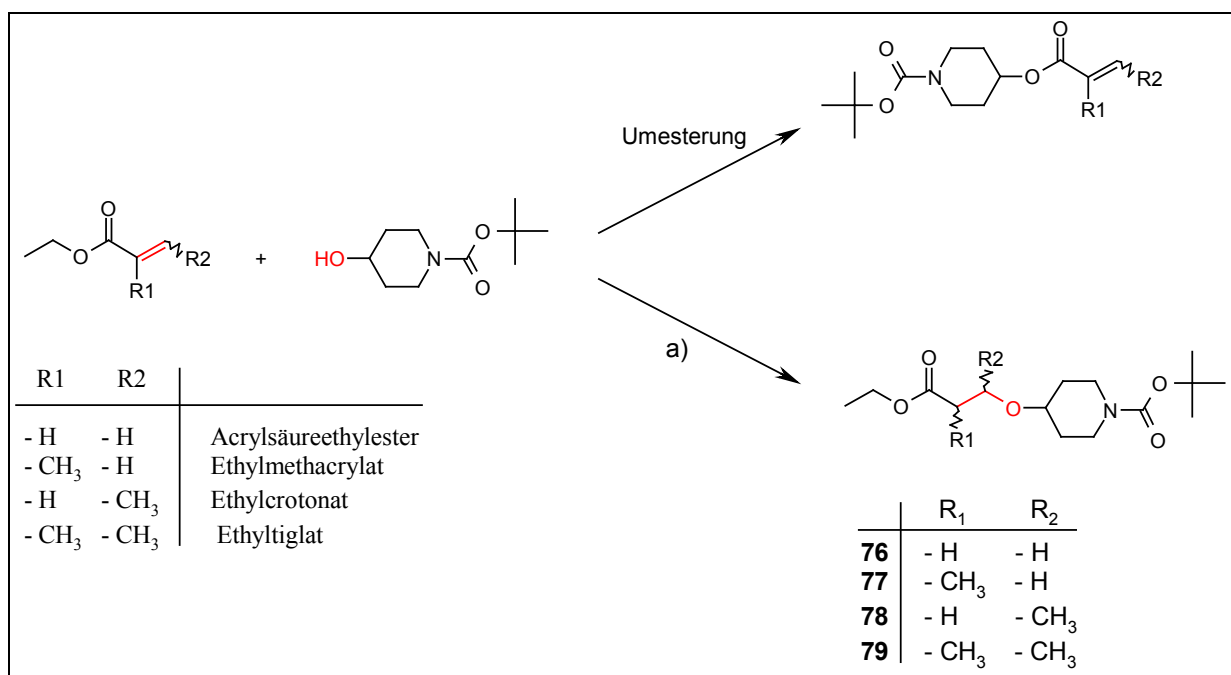
Da die Reaktion auf Festphase schwierig durchzuführen und vor allem zu analysieren ist, erschien es auf dieser Stufe der Syntheseoptimierung einfacher, weitere Reaktionsbedingungen anhand von Synthesen in Lösung zu optimieren.

Um die Synthese auf dem Harz nach einer Synthese in Lösung zu übertragen, musste der Acrylsäure-Baustein durch einen entsprechenden Ester ersetzt werden, der die elektronischen Eigenschaften am Harz simuliert. Damit die Struktur des Bausteines auf dem Harz mit dem Baustein in Lösung einigermaßen übereinstimmt, wurden die entsprechenden Ethylester gewählt (**Schema 27**).



Schema 27. Ausgewählter Baustein für die Imitation einer nucleophilen Addition am Harz durch eine Synthese in Lösung

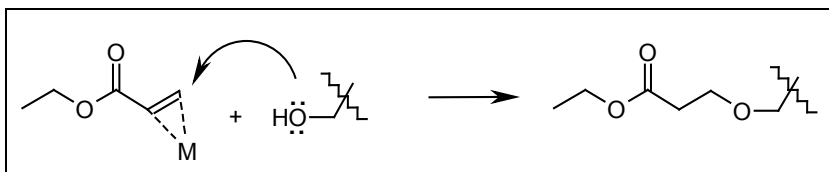
Um die Addition des Aminoalkohols an die vinylenische Doppelbindung zu optimieren, wurden Acrylsäureethylester, Methacrylsäureethylester, Ethylcrotonat und Ethyltiglat gewählt (**Schema 28**). Diese vier Kombinationen stellen alle möglichen Substitutionsmuster dar und sollten auch ungefähr repräsentativ für die Reaktivitäten der für die komb. Bibliothek ausgewählten Acrylsäuren (**Tabelle 16**) sein.



Schema 28. Nucleophile Addition eines Alkohols an einen Acrylbaustein in Lösung: a) Verschiedene basische Reaktionsbedingungen vgl. **Tabelle 24**

Zuerst wurde nur Ethylmethacrylat mit N-Boc-4-Hydroxypiperidin zu **77** umgesetzt. Dieser geschützte Aminoalkohol wurde gewählt, da er kommerziell erhältlich ist und nicht kritisch ist, was diese Reaktion angeht, wie an den vorherigen Experimenten erkennbar ist.

Die Reaktionsbedingungen einer ersten Serie an Testreaktionen sind in **Tabelle 24** aufgeführt. Es wurden LDA oder NaH als Basen und drei verschiedene Lewissäuren eingesetzt. Lewissäuren scheinen diese Reaktion (**Schema 29**) insbesondere wenn Amine eingesetzt werden, sehr effizient zu katalysieren ¹⁵⁴.



Schema 29. Mechanismus einer Lewisäure-katalysierten Michael-Addition

Die Reaktionsgemische wurden mit diversen Aktivierungsmethoden untersucht. Da die Edukte nicht und die Produkte nur schwach UV-aktiv sind und im ISP-MS die Produkte nur sehr schlecht ionisierbar sind, konnte die Produktbildung nur schwer quantifiziert werden. Deshalb wurden die Reaktionsgemische mit 0.1 M Zitronensäure angesäuert und das Produkt mit Diethylether extrahiert und aufgearbeitet.

| Reaktionsbedingungen | Lösungsmittel | Reagenzien | HPLC | MS (M+H) ⁺ | DC | nach Aufarbeitung |
|---|---------------|---|---|-----------------------|----|-------------------|
| 20 h, RT, Argon | 5 ml THF | ^{*5} LDA, | OK | 316, 333 | b) | 35% |
| 20 h, RT, Argon | 5 ml THF | ^{*4} NaH | OK | 316, 333 | OK | 40% |
| 20 h, RT, Argon | 5 ml THF | ^{*4} NaH, ^{*6} 18-Crown-6 | b) | a) | b) | a) |
| 20 h, RT, Argon | 5 ml DMF | ^{*1} 0.1 equ. Pd(OAc) ₂ | a) | a) | a) | - |
| 20 h, RT, Argon | 5 ml THF | ^{*2} 0.1 equ. BF ₃ | a) | a) | a) | - |
| 20 h, RT, Argon | 5 ml THF | ^{*3} 0.1 equ. Fe(Cl) ₃ | a) | a) | a) | - |
| a) keine Reaktion beobachtbar b) nicht interpretierbar ^{*1} 0.1 equ. Pd(OAc) ₂ = 0.05 mMol, 0.5 ml 0.1 M Lsg. ^{*2} 0.1 equ. BF ₃ = 0.05 mMol, 0.5 ml 0.1 M Lsg. ^{*3} 0.1 equ. Fe(Cl) ₃ = 0.05 mMol, 0.5 ml 0.1 M Lsg. | | | ^{*4} 5 equ. NaH, 60 mg ^{*5} 5 equ. LDA, 267 ml ^{*6} 10 equ. 18-Crown-6 | | | |

Tabelle 24. Reaktionsbedingungen für die erste Serie der Optimierung der Michael-Reaktion zu **77**, mit Ethylmethacrylat als Michaelakzeptor. Es wurden jeweils 0.5 mMol N-boc-4-hydroxypiperidin und 0.55 mMol Ethylmethacrylat eingesetzt. Es wurde unter Raumtemperatur und unter Argon gearbeitet.

Aus den Resultaten geht hervor, dass die Base entscheidend für die Reaktivität ist. Nur die Ansätze mit NaH oder LDA als Base haben reagiert, obwohl die Ausbeuten jeweils noch niedrig sind. Die Ansätze bei denen anstelle einer Base eine Lewisäure eingesetzt wurde, zeigten überhaupt keine Anzeichen einer Reaktion.

In einem erneuten Versuch wurden jeweils der α -substituierte und der β -substituierte Baustein eingesetzt (**Tabelle 25**), wobei als weitere Variante noch Butyllithium als starke Base verwendet wurde:


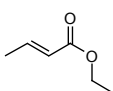
| | Reaktions- bedingungen | Lösungs- mittel | Base | Edukt | HPLC | MS (M+H) ⁺ | ¹ H-NMR | Nach Extraktion |
|--|---------------------------|--------------------|--------------------|---|---|--------------------------|--------------------|--------------------|
| 77 | 20 h, RT, Ar | 5 ml THF | ^{*1} NaH | Ethylmethacrylat | Edukt | 316, 333 | OK/ Edukt | - |
| | 20 h, RT, Ar | 5 ml THF | ^{*2} LDA |  | sauber | 316, 333 | OK | 23% |
| | 20 h, RT, Ar | 5 ml THF | ^{*3} BuLi | | Edukt | 316, 333 | b) | - |
| 78 | 20 h, RT, Ar | 5 ml THF | ^{*1} NaH | Ethylcrotonat | Edukt | b) | - | - |
| | 20 h, RT, Ar | 5 ml THF | ^{*2} LDA |  | sauber | 316, 333 | OK | 16% |
| | 20 h, RT, Ar | 5 ml THF | ^{*3} BuLi | | Edukt | b) | b) | - |
| a) nicht interpretierbar b) keine Reaktion sichtbar | | | | | ^{*2} 5 equ. LDA, 267 µl ^{*3} 5 equ. BuLi (1,6 M soln.), 1.6 ml | | | |
| ^{*1} 5 equ. NaH, 60 mg | | | | | | | | |

Tabelle 25. Reaktionsbedingungen für zweite Optimierungsrunde. Es wurden jeweils 0.5 mMol N-Boc-4-Hydroxypiperidin und 0.55 mMol (1.1 Äquivalente) der einfach methylysubstituierten Acrylester eingesetzt.

Aus den bisherigen Resultaten ist ersichtlich, dass NaH zwar noch ausreichend reaktiv ist, um das Alkoholat an nicht- und an α -substituierte Acrylsäure zu addieren, nicht aber an β -Substituierte, wobei LDA als Base merkbar effizienter ist, jedoch unter diesen Bedingungen noch eine zu niedrige Ausbeute liefert.

In einem weiteren Optimierungsschritt wurde Ethylcrotonat, Ethylmethacrylat und Ethyltiglat eingesetzt und die Temperatur erhöht (**Tabelle 26**), die bisher immer konstant auf Raumtemperatur gehalten wurde. Wiederum wurden die RG angesäuert, mit Ether extrahiert und untersucht.

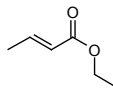
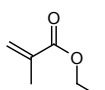
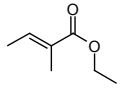
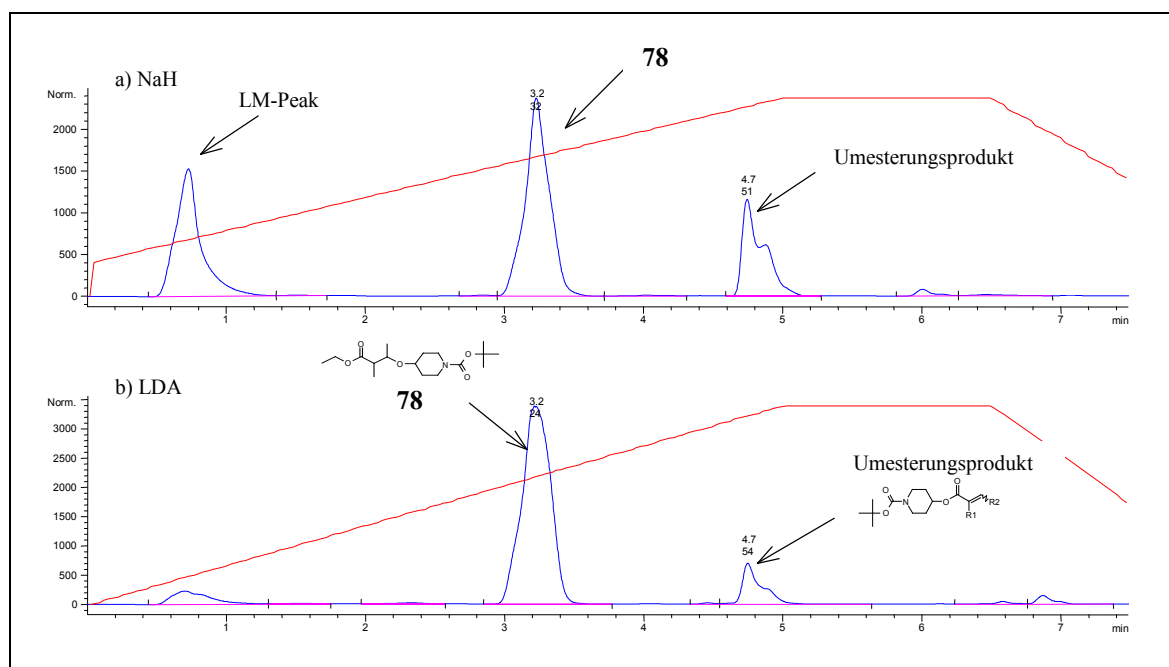
| | Reaktions- bedingungen | Lösungs- mittel | Base | Edukt | HPLC | MS (M+H) ⁺ | DC | Nach Extraktion |
|--|---------------------------|--------------------|-------------------|---|---|--------------------------|----|--------------------|
| 78 | 4 h, 50°C, Ar | 5 ml THF | ^{*1} NaH | Ethylcrotonat | b) | b) | a) | - |
| | 24 h, 50°C, Ar | | |  | OK | OK | OK | - |
| | 4 h, 50°C, Ar | 5 ml THF | ^{*2} LDA | | OK | OK | a) | - |
| | 24 h, 50°C, Ar | | | | OK | OK | OK | - |
| 77 | 4 h, 50°C, Ar | 5 ml THF | ^{*1} NaH | Ethylmethacrylat | OK | OK | a) | - |
| | 24 h, 50°C, Ar | | |  | OK | OK | OK | - |
| | 4 h, 50°C, Ar | 5 ml THF | ^{*2} LDA | | OK | OK | a) | - |
| | 24 h, 50°C, Ar | | | | OK | OK | OK | - |
| 79 | 4 h, 50°C, Ar | 5 ml THF | ^{*1} NaH | Ethyltiglat | OK | OK | a) | - |
| | 24 h, 50°C, Ar | | |  | OK | OK | OK | - |
| | 4 h, 50°C, Ar | 5 ml THF | ^{*2} LDA | | OK | OK | OK | - |
| | 24 h, 50°C, Ar | | | | OK | OK | OK | 84% |
| a) nicht interpretierbar b) keine Reaktion sichtbar | | | | | ^{*1} 5 equ. NaH, 60 mg ^{*2} 5 equ. LDA, 267 ml | | | |

Tabelle 26. Reaktionsoptimierung mit erhöhter Temperatur

Die HPLC-Analysen der Reaktionen aus **Tabelle 26** zeigen, dass die Ausbeuten mit LDA als Base deutlich höher sind, als mit NaH als Base, unabhängig des Substitutionsmusters am Acrylbaustein. Dies ist übereinstimmend mit den vorherigen Resultaten, bei denen mit LDA als Base der Alkohol mit allen Varianten des substituierten Acrylbausteins reagierte. Zudem ist das Ausmass an Nebenprodukt (das Umesterungsprodukt, **Schema 28**) mit LDA bei weitem nicht so gross. Ein Vergleich der HPLC-Chromatogramme mit Identifizierung der Peaks durch MS-Analyse, ist in **Figur 41** dargestellt. Aus den vorliegenden Resultaten kann auch gefolgert werden, dass die erhöhte Temperatur das Gleichgewicht stark auf die Produktseite bringt, ohne aber den Disulfidlinker zu spalten. Erstaunlicherweise ist bei allen Versuchen das Hauptprodukt das Michael-Produkt und nicht das unerwünschte Umesterungsprodukt (**Schema 28**).

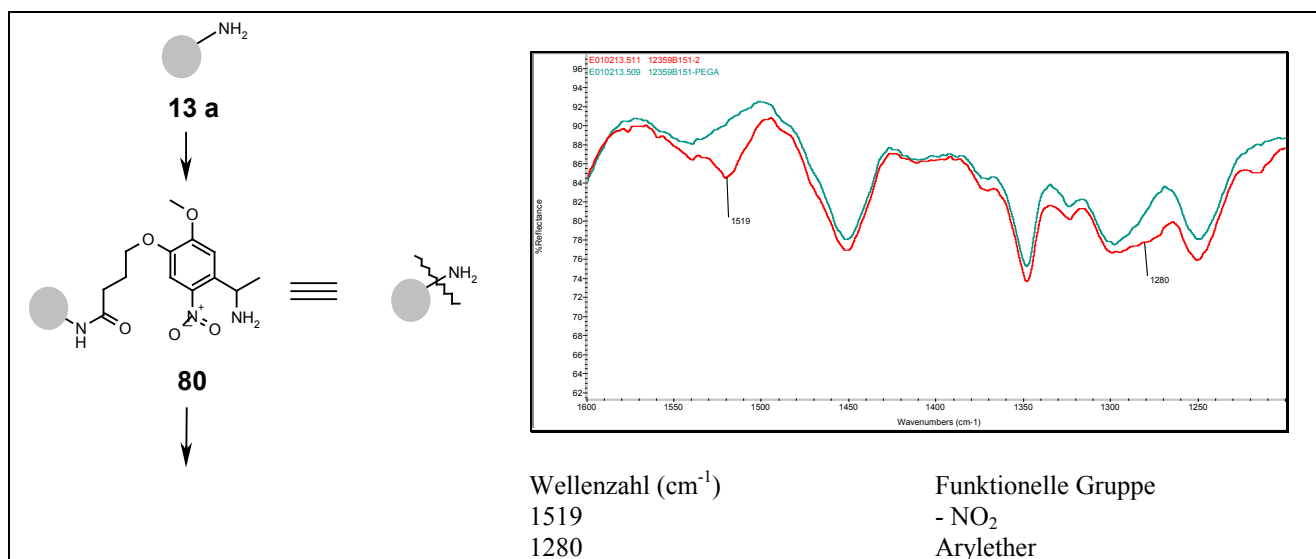


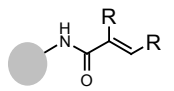
Figur 41. Vergleich der HPLC-Chromatogramme der Reaktion von N-Boc-4-Hydroxypiperidin mit Ethylcrotonat und a) NaH und b) LDA als Base

Die Reaktion aus **Schema 28** mit Ethyltiglat als Baustein zu **79** wurde noch einmal in präparativem Massstab in Lösung durchgeführt, mit einer Ausbeute von 80 % an dem gewünschten Produkt. Gemäss HPLC- und MS-Analysen ist dieses in Lösung (Acetonitril) aber nicht stabil, innerhalb von einigen Stunden verschwindet der Hauptpeak und der Peak des Nebenproduktes wird grösser.

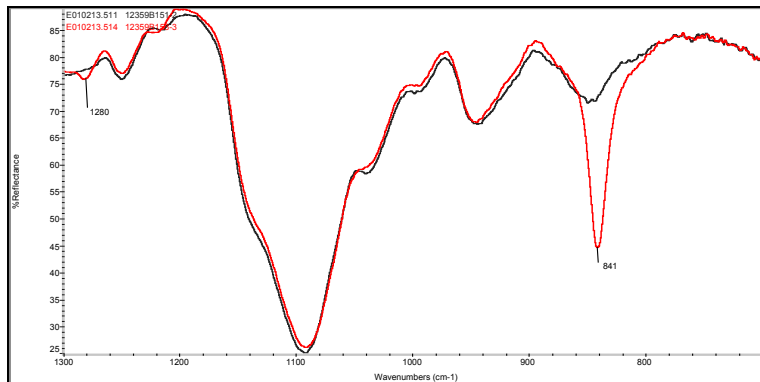
7.4 Analyse der Reaktionssequenz „on-bead“ mit ATR-IR

Da die Reaktion mit LDA in Lösung so erfolgreich verlief, wurde sie für die Festphase übernommen und unter den identischen Bedingungen durchgeführt. Nach Abspaltung des Produktes auf verschiedenen Stufen der Synthese ist zwar jeweils ein MS-Peak zu erkennen, jedoch entsprechen die beobachteten Massen nicht den erwünschten Produkten. Eventuell sind die gewünschten Produkte nur sehr schlecht ionisierbar oder die Beladung an Endprodukt ist zu gering. Deshalb wurde die ganze Synthesesequenz noch einmal unter den anfangs benutzten Bedingungen, die für unsubstituierte Acrylsäuren reproduzierbare Resultate lieferten, mit NaH als Base unter erhöhten Temperaturen durchgeführt. Als Linker wurde ein Photolinker eingesetzt, um sicher zu gehen, dass die basischen Bedingungen den Linker nicht spalten. Auf jeder Stufe wurden Aliquote des Harzes entnommen, und mittels ATR-IR-Spektroskopie analysiert. Mit dieser Methode können die meisten Veränderungen von funktionellen Gruppen am Harz beobachtet werden und somit die Reaktionssequenz auf jeder Stufe mit der vorherigen Stufe verglichen werden. Es wurden zwei Sequenzen parallel synthetisiert, eine mit unsubstituierter Acrylsäure und die andere mit Crotonsäure, also α - und β -methylsubstituiert. Bei beiden Sequenzen konnte auf jeder Stufe eindeutig der Verlauf der Reaktion beobachtet werden. Eine Quantifizierung der Umsätze ist nicht möglich, jedoch ist das Auftreten und Verschwinden der zu den funktionellen Gruppen gehörigen Peaks immer gut sichtbar. In **Figur 42** sind für jeden Reaktionsschritt die Veränderungen im IR verglichen mit der jeweils vorherigen Synthesestufe, dargestellt:



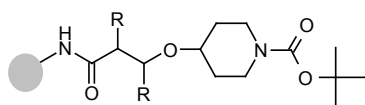


81 R = - H
91 R = - CH₃

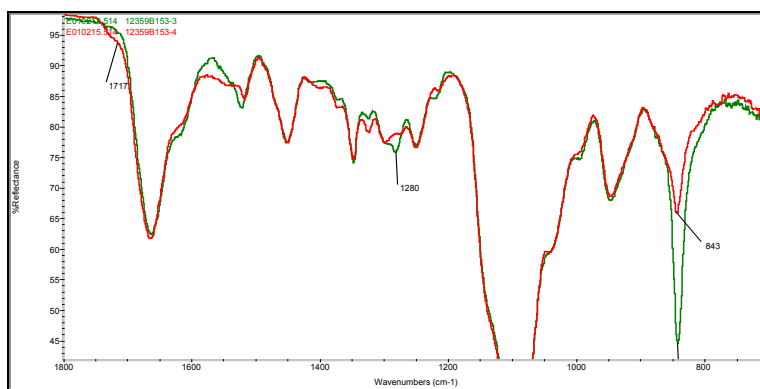


Wellenzahl (cm⁻¹)
 844

Funktionelle Gruppe
 - vinyl

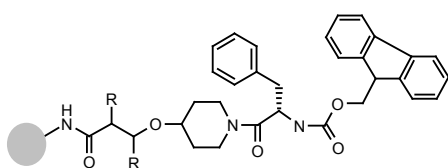


82 R = - H
92 R = - CH₃

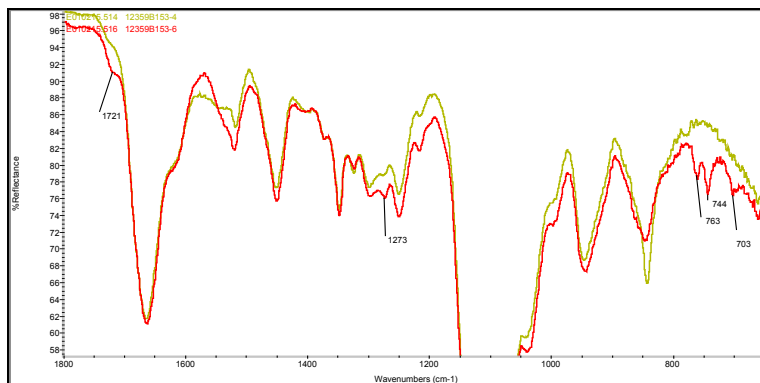


Wellenzahl (cm⁻¹)
 843
 1280
 1717

Funktionelle Gruppe
 - vinyl verschwindet
 - Ether
 - Carbamat

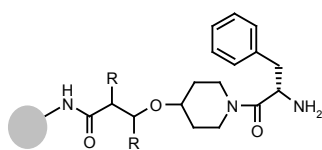


83 a R = - H
93 a R = - CH₃

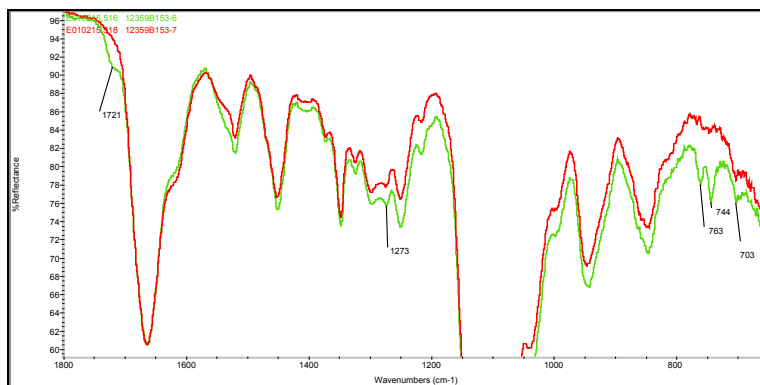


Wellenzahl (cm⁻¹)
 703
 744
 763
 1719

Funktionelle Gruppe
 - monosubst. Aromat
 - orthosubst. Aromat
 - monosubst. Aromat
 - Carbamat

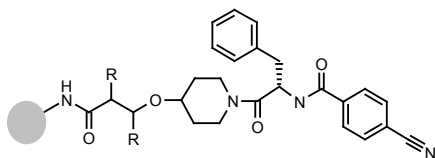


83 b R = - H
93 b R = - CH₃

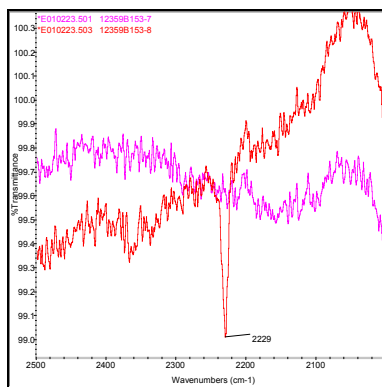


Wellenzahl (cm⁻¹)
 744
 1721

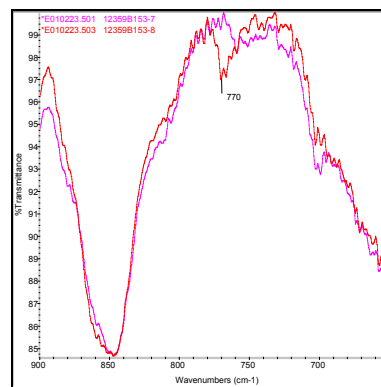
Funktionelle Gruppe
 - orthosubst. Aromat verschw.
 - Carbamat verschwindet



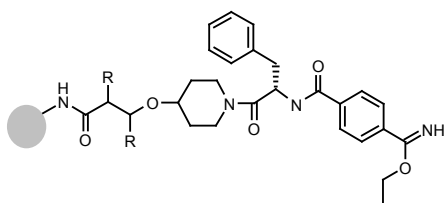
84 R = - H
94 R = - CH₃



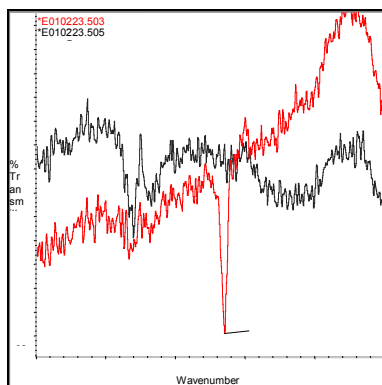
Wellenzahl (cm⁻¹)
 2229
 770



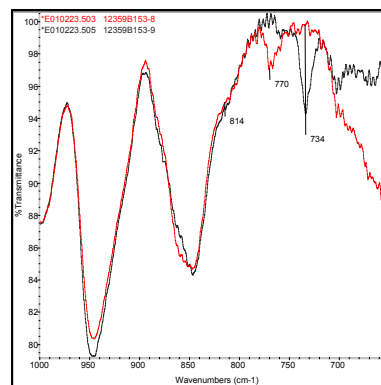
Funktionelle Gruppe
 - CN
 - parasubst. Aromat



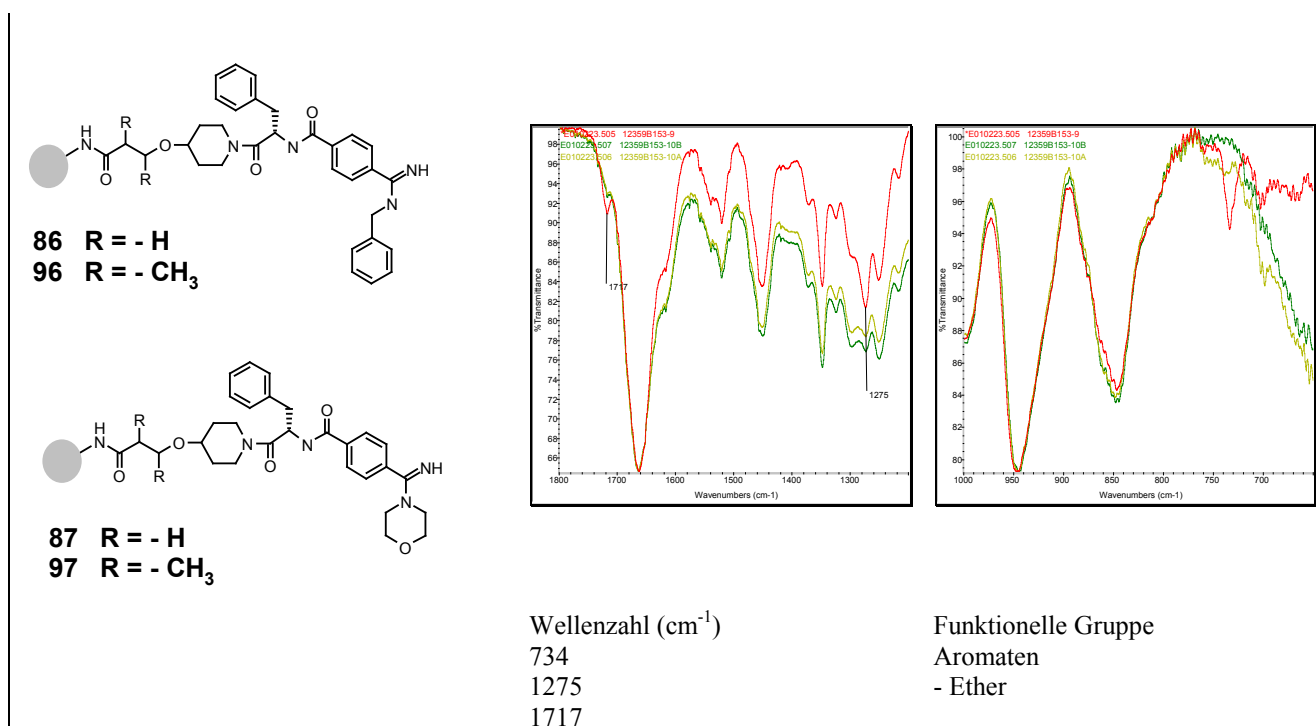
85 R = - H
95 R = - CH₃



Wellenzahl (cm⁻¹)
 2229
 734/770



Funktionelle Gruppe
 - CN verschwindet
 - parasubst. Aromat



Figur 42: Reaktionssequenz zur Synthese eines Lamifiban-Analogs verfolgt mit IR (ATR-IR). Dargestellt ist die Sequenz mit unsubstituierter Acrylsäure (R = -H). Die Sequenz mit Crotonsäure (R = -CH₃) ist vergleichbar.

Die Analyse der beiden Reaktionssequenzen zeigt, dass alle Reaktionen unter Verwendung von unsubstituierten (**81** → **86** / **87**) und substituierten (**91** → **96** / **97**) Acrylsäuren in zufriedenstellendem Masse ablaufen.

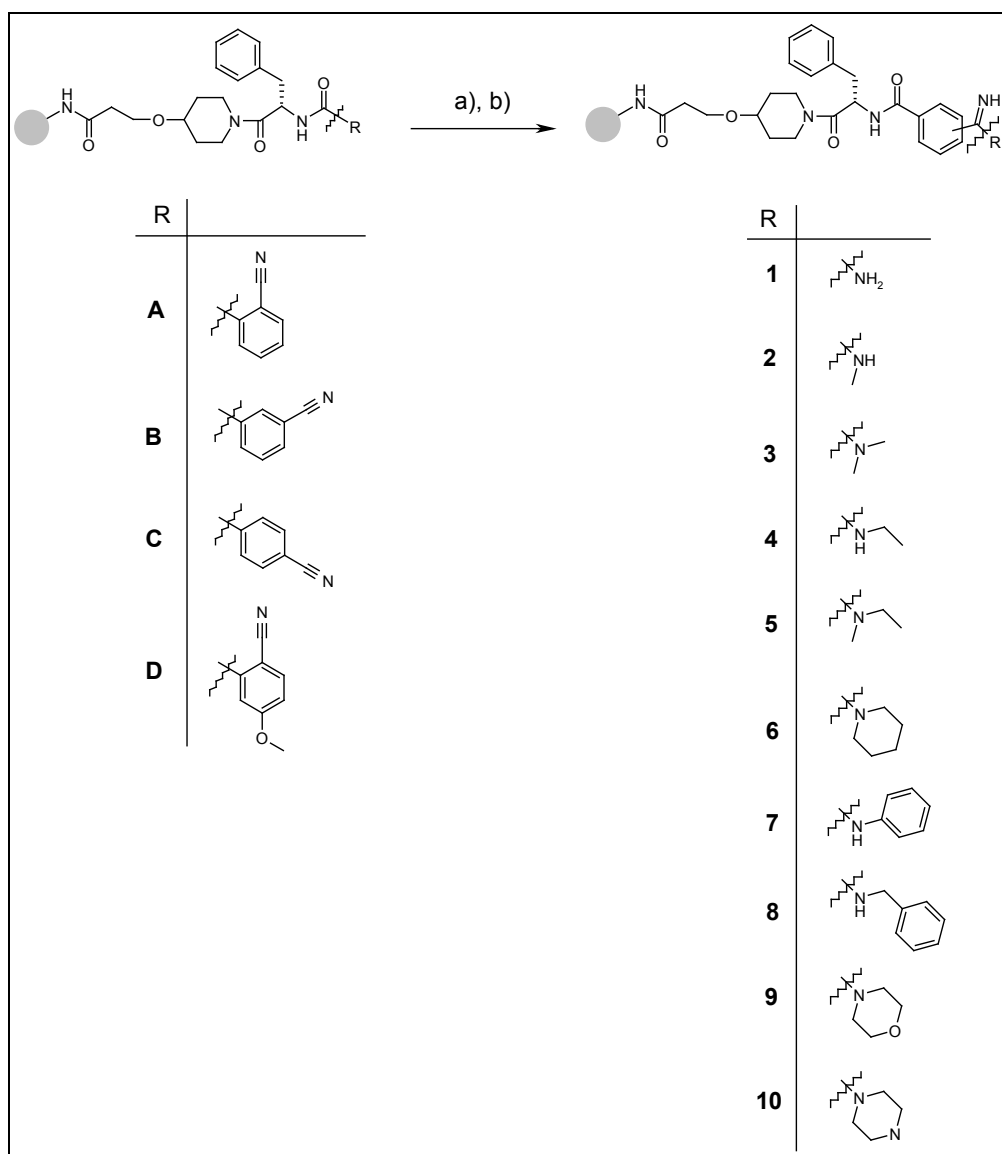
7.5 Synthese und Screening der Verbindungsbibliotheken auf der Basis eines evolutionären Ansatzes

Nachdem die Nitrilreduktion zu den subst. Amidinen und die Michael-Addition eines Alkohols an ein vinyloges System auf Festphase, über beide Reaktionen existiert keine Literatur, optimiert worden sind, wurde die gesamte Reaktionssequenz zum Lamifiban-Analoga unter Einsatz von den verschiedenen Bausteinen sequenziell optimiert.

7.5.1 Optimierung des Amidinobenzoesäure-Bausteins

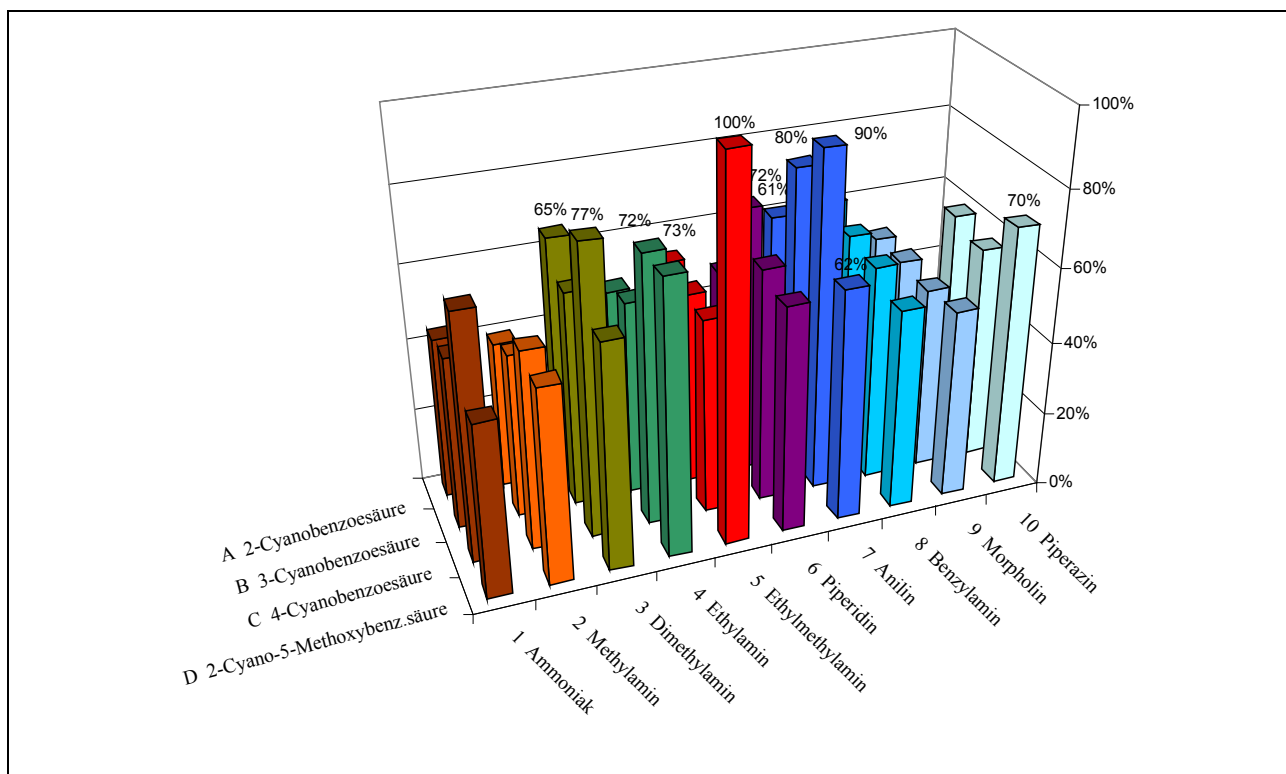
Ein Lamifiban-ähnliches Gerüst wurde auf PEGA-Harz mit den optimierten Verfahren bis zur vorletzten Stufe zu **83 b**, der Kopplung der Aminosäure synthetisiert. Als Standardbausteine wurde die unsubstituierte Acrylsäure, danach 4-Hydroxypiperidin und als Aminosäurebaustein wurde

Phenylalanin gewählt (vgl. **Figur 42**). Anschliessend wurden die in **Tabelle 19** aufgeführten verschieden substituierten Cyanobenzoesäuren gekoppelt. Die vier verschieden substituierten Harz-Aliquote wurden dann je mittels Pinner-Reaktion und den zehn verschiedenen Aminen zu den substituierten Amidinen **A-1** bis **A-10**, **B-1** bis **B-10**, **C-1** bis **C-10** und **D-1** bis **D-10** umgesetzt (**Schema 30**), was eine Bibliothek von 40 Verbindungen ergab.



Schema 30. Optimierung des Amidino-Bausteines: i) A: HATU, DIPEA, NMP, 2-Cyanobenzoesäure, RT, 2 h; B: HATU, DIPEA, NMP, 3-Cyanobenzoesäure, RT, 2 h; C: HATU, DIPEA, NMP, 4-Cyanobenzoesäure, RT, 2 h; D: HATU, DIPEA, NMP, 5-Methoxy-2-cyanobenzoesäure, RT, 2 h; ii) Amine (1 – 20)/EtOH, RT, 20 h.

Das nachfolgende Screening der Bibliotheken mit fluoreszenzmarkiertem monoklonalem Antikörper wurde nach der Methode in Kapitel 3.4 durchgeführt. Es wurden pro Harzprobe vier Bilder aufgenommen und pro Bild fünf Beads ausgemessen. Die darauffolgende statistische Auswertung der erhaltenen Daten für die 40 Verbindungen ergab das in **Graphik 7** dargestellte Resultat.

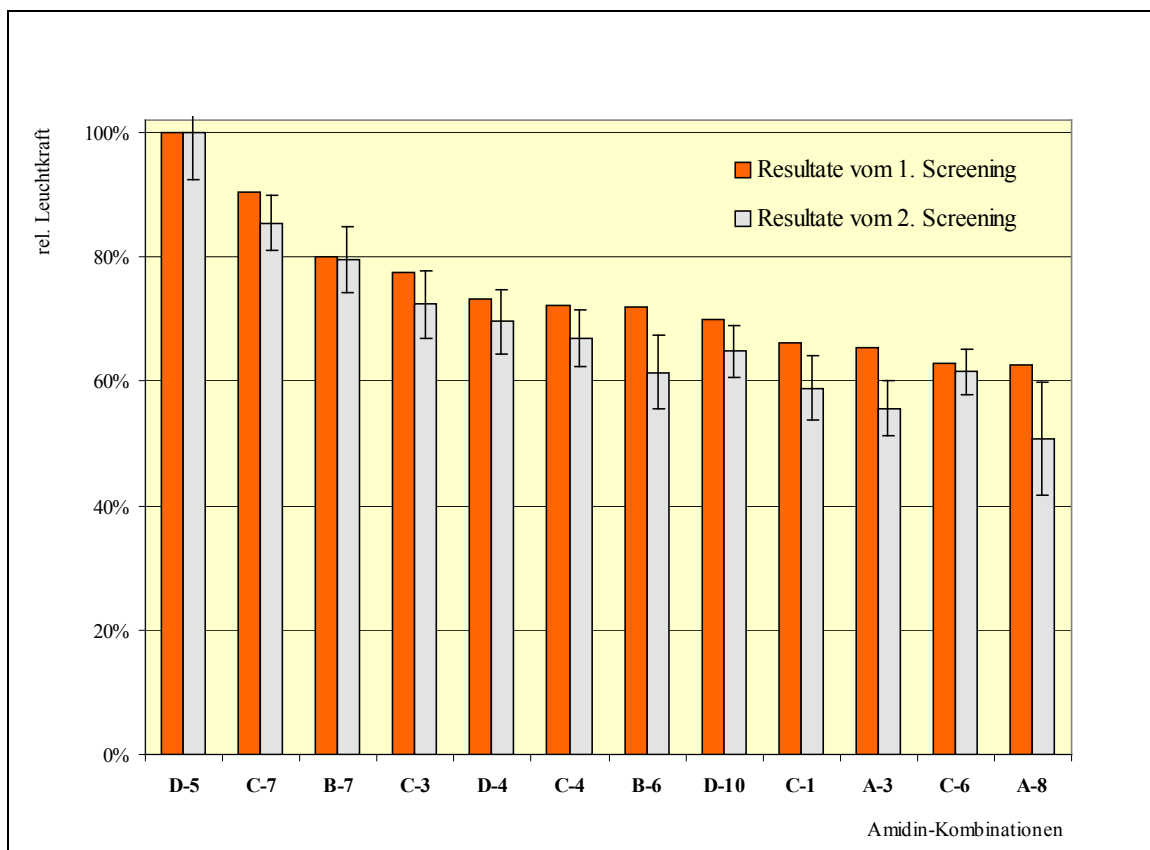


Graphik 7. Graphische Darstellung des ersten Screeningresultates zur Optimierung der Benzoessäure-Amidin-Komponente; die Leuchtintensitäten sind auf 100 % normiert. Bedingungen des Screenings: RGB = 50/100/100, Bg = schwarz, matt, c(mAB) = 1 μ M, t_{inkub} = 20 h

Wie aus der **Graphik 7** zu entnehmen ist, gibt es zwei sehr aktive Verbindungen: Einerseits die Kombination 2-Cyano-5-Methoxybenzoessäure mit Ethylmethylamin **D-5** (2-(N,N-Ethyl-methyl)-5-Methoxybenzamidin), andererseits die 4-Cyanobenzoessäure mit Anilin **C-7** ((N-Benzyl)-4-Benzamidin). Bei ersterer Kombination ist erstaunlich, dass Ethylmethylamin mit allen anderen Benzoessäurekomponenten nicht sehr aktiv ist und die aktive Verbindung sich sehr stark von den anderen abhebt. Bei der zweiten Kombination ist ersichtlich, dass Anilin mit allen drei monosubstituierten Benzoessäurekomponenten ziemlich aktiv ist.

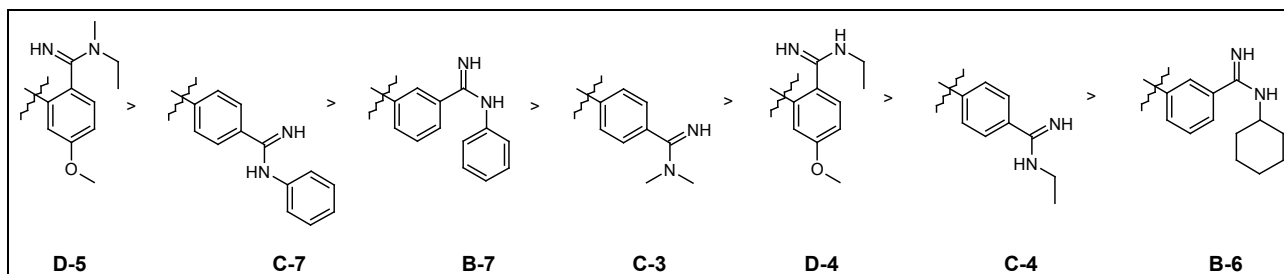
Wie erwartet, stimmt das erhaltene Bild tendenziell mit schon bekannten Resultaten überein. Die Kombinationen mit 4-Cyanobenzoessäure sind unabhängig von der nachfolgenden Amidinsubstitution durchschnittlich am aktivsten. Auch Lamifiban und weitere aktive GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten besitzen eine 4-Amidinobenzoessäure als N-terminalen Abschluss.

Um zufällige Fehler bei der statistischen Auswertung der relativen Leuchtstärken zu vermeiden, wurden die aktivsten 12 Verbindungen des ersten Screeningdurchganges noch einmal unter anderen Bedingungen (mAB-Konzentration nur noch 0.5 μ M) getestet und mit dem vorherigen Resultat verglichen (**Graphik 8**).



Graphik 8. Kontrolle der Screeningresultate der ersten Substanzbibliothek. Die Leuchtintensitäten sind für beide Serien auf 100 % normiert. Die roten Balken stellen die Leuchtintensitäten aus dem ersten Screening, die hellgrauen Balken diejenigen aus dem Kontrollscreening dar. Die Werte sind nach absteigender Intensität des ersten Screenings geordnet. Einstellungen an der CCD-Kamera für das Screening: RGB = 50/100/100, Bg = schwarz, matt, $c_{\text{mAB}} = 0.5 \mu\text{M}$, $t_{\text{Inkub}} = 20 \text{ h}$

Die Resultate aus diesem Kontroll-Screening zeigen, dass die statistische Auswertung in diesem Fall erstaunlich zuverlässig ist. Die Reihenfolge der aktivsten Verbindungen bleibt bis auf kleine Unregelmäßigkeiten im weniger aktiven Bereich dieselbe (**Figur 43**).

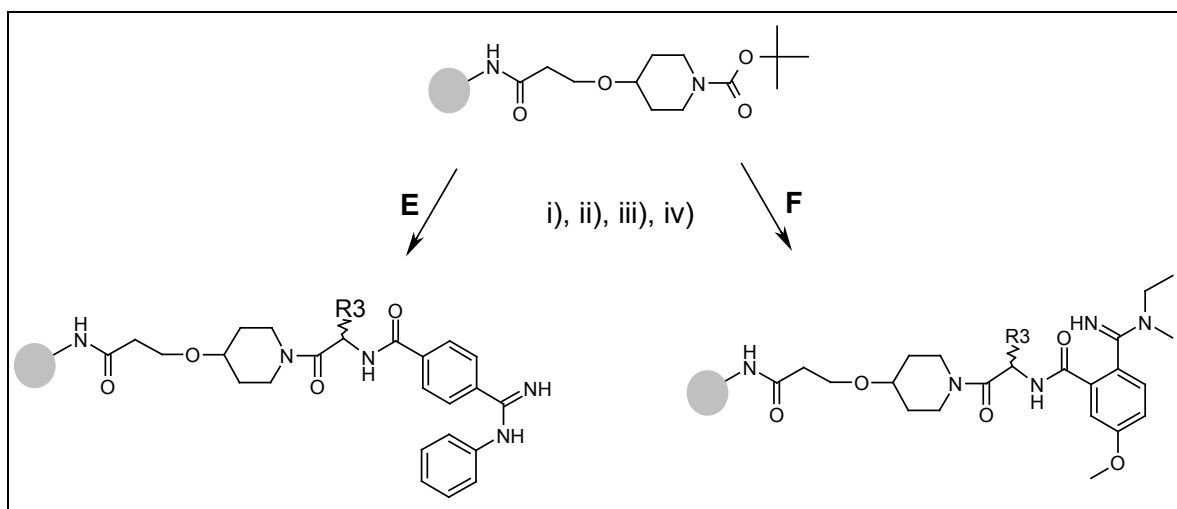


Figur 43. Strukturen der aktivsten Amidinbausteine aus dem mAB-Screening

Jedoch zeigen die Resultate auch, dass die Standardabweichungen der statistischen Auswertungen ziemlich hoch sind. Diese betragen durchschnittlich um die 10 %, unabhängig vom Durchschnittswert der Leuchtintensität. In **Graphik 8** ist zu erkennen, dass sich nur die aktivsten zwei bis drei Verbindungen wirklich von den Anderen abheben und auch hier Überlappungen auftreten. Bei allen anderen weniger aktiven Substanzen ist der Leuchtintensitätsbereich stark überlappend. Es ist wahrscheinlich, dass die Reihenfolge nur tendenziell stimmt und infolge systematischer oder apparativer Fehler leicht variieren kann. Bei solch kleinen Variationen der Leuchtintensität ist auch nicht auszuschliessen, dass die Güte der Reaktionen mit den verschiedenen Aminen eine Auswirkung auf das beobachtete Resultat im mAB-Screening hat.

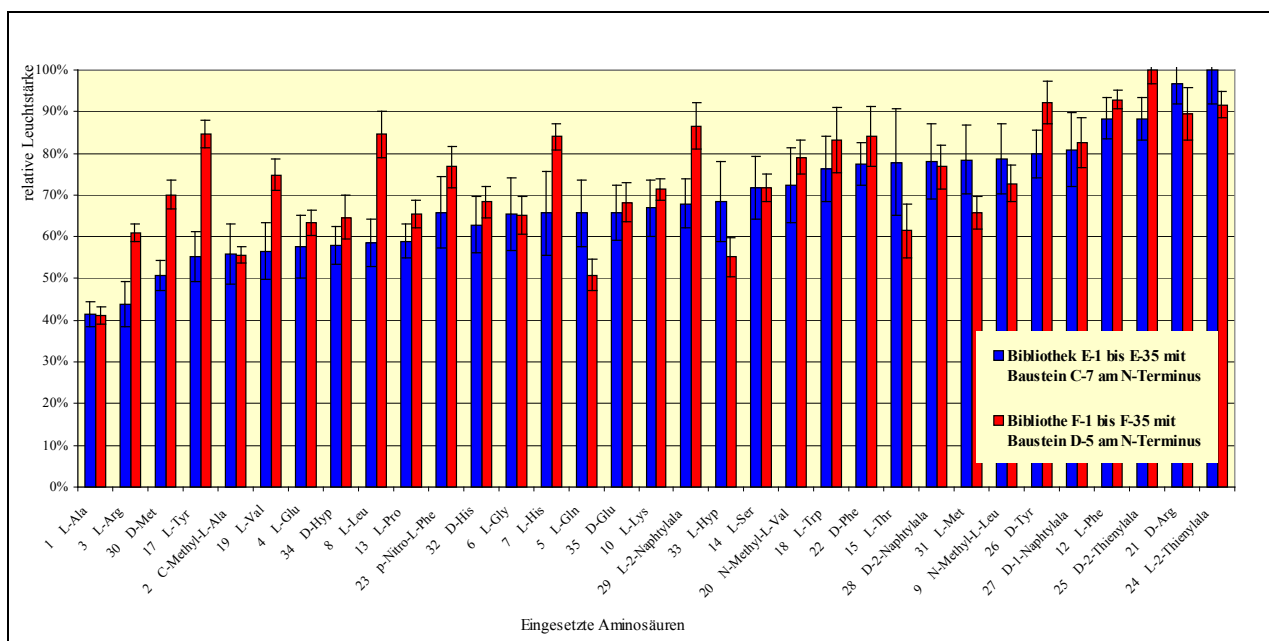
7.5.2 Optimierung des Aminosäure-Bausteins

Zur weiteren Optimierung des Lamifiban-Gerüsts wurden zwei Syntheserouten parallel verfolgt: Die beiden aktivsten Amidinobausteine aus der ersten Screeningstufe **D-5** und **C-7** wurden für die Optimierung des Aminosäurebausteins weiter eingesetzt (**Schema 31**). Zur Optimierung des Aminosäurebausteins wurden 33 natürliche, unnatürliche und modifizierte Aminosäuren eingesetzt (**Tabelle 18**) was für das nachfolgende statistische Screening eine Bibliothek von 66 Verbindungen ergab.



Schema 31. Die beiden Syntheserouten zur Optimierung des Aminosäurebausteins: i) TFA/H₂O/TIPS; ii) HATU, DIPEA, NMP, Aminosäure (1 – 33), RT, 2 h; 20 % Piperidin, 5 Min. E: iii) HATU, 4-Cyanobenzoesäure, DIPEA, RT, 2 h; iv) HCl/EtOEt/EtOH, RT, 2 h; Anilin/EtOH, RT, 20 h; F: iii) HATU, 5-Methoxy-2-cyanobenzoesäure, DIPEA, RT, 2 h; iv) HCl/EtOEt/EtOH, RT, 2 h; Ethylmethylamin/EtOH, RT, 20 h.

Die statistische Auswertung des Screenings mit fluoreszenzmarkiertem monoklonalem Antikörper ergab das in **Graphik 9** dargestellte Bild.

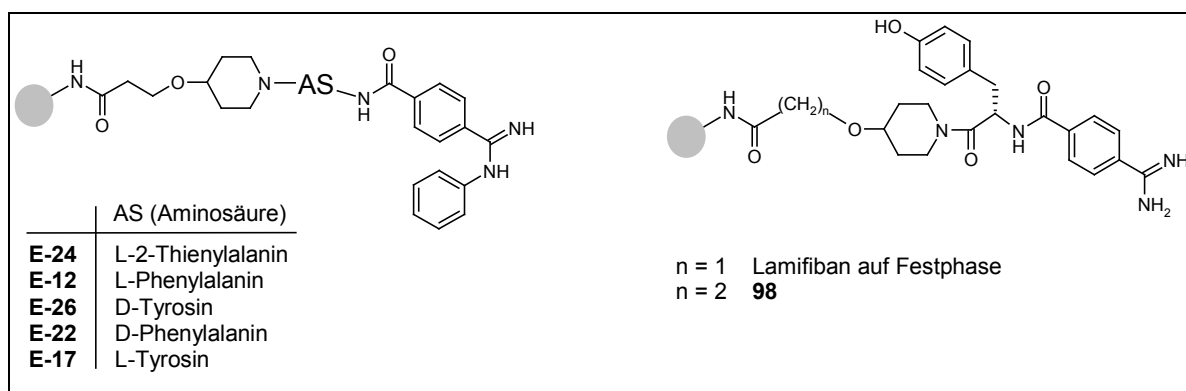


Graphik 9. Resultat des Screenings der „Aminosäure“-Bibliotheken, wobei die Intensitäten auf 100 % normiert sind und die Verbindungen der **Bibliothek E** mit dem **C-7**-Terminus nach steigender Aktivität angeordnet sind. Die entsprechenden Verbindungen der **Bibliothek F** mit dem **D-5**-Terminus sind jeweils daneben dargestellt. Die relativen Leuchtstärken sind über alle Verbindungen auf 100 % normiert.

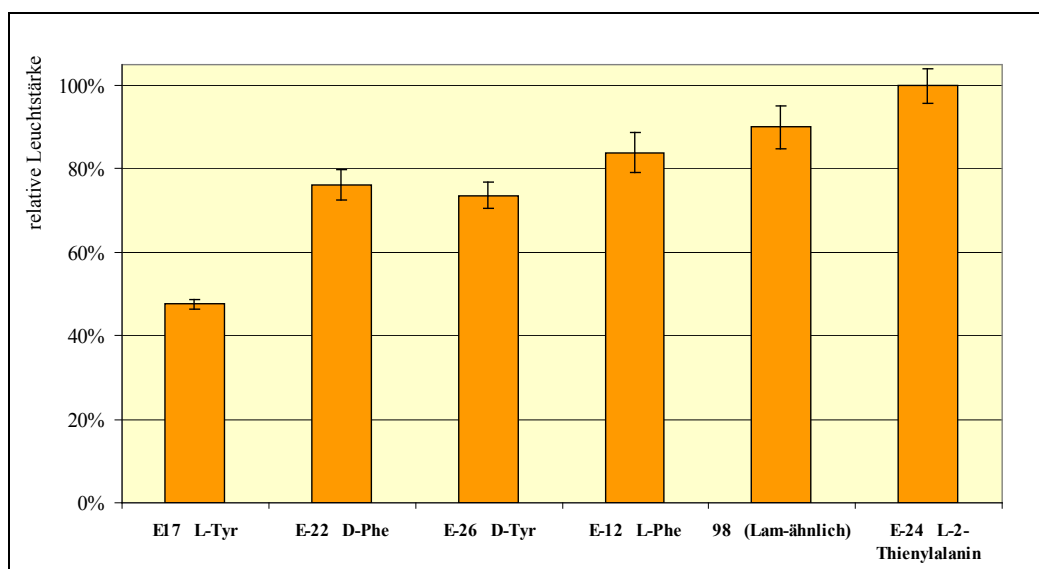
In der Graphik nicht ersichtlich ist die Tatsache, dass die Intensitäten der **Bibliothek E** allgemein deutlich intensiver waren als die der **Bibliothek F**. Dies zeigt wiederum deutlich, dass der Antikörper eindeutig zwischen den verschiedenen Substitutionsmustern der Benzamidine differenziert und die Geometrie des Originalmoleküls bevorzugt. Deshalb sind die Resultate nach zunehmender Aktivität der aktiveren **Bibliothek E** geordnet (blau), wobei die entsprechenden Werte der weniger aktiven **Bibliothek F** zu Vergleichszwecken auch aufgeführt sind (rot). Die aktivsten Verbindungen sind diejenigen mit L-Thienylalanin (**E-24**), D-Arginin (**E-21**) und D-Thienylalanin (**E-25**) sowie L-Phenylalanin (**E-12**) als Aminosäurebausteine. Danach folgen D-1-Naphtylalanin (**E-27**) und D-Tyrosin (**E-26**).

Bemerkenswert ist auch bei diesem Screening, dass die aktivsten Verbindungen bei beiden Bibliotheken ungefähr dieselben Aminosäurebausteine enthalten. Das deutet auf eine relativ geringe Flexibilität des Gerüsts und einen gleichbleibenden Bindungsmodus am mAB hin, was einem evolutionären Synthese- und Screeningansatz zu Gute kommt. Bei der **Bibliothek F** fällt auf, dass es einige Werte gibt, die nicht mit denen der (N-Benzyl)-4-Benzamidin-Bibliothek korrelieren. Dies sind L-2-Naphtylalanin (**F-29**), L-Histidin (**F-7**), L-para-Nitro-Phenylalanin (**F-23**), L-Leucin (**F-8**), L-Valin (**F-19**) und L-Tyrosin (**F-17**) als Aminosäurekomponenten. Hierbei fällt auf, dass es sich hauptsächlich um hydrophobe und/oder aromatische Aminosäuren handelt. Dies kann einerseits auf unspezifische Wechselwirkungen des Moleküls mit dem mAB oder doch auf einen unterschiedlichen Bindungsmechanismus, hervorgerufen durch eine andere Molekülgeometrie des Moleküls, zurückgeführt werden.

Ein weiterer Vergleich einiger Substanzen aus dieser Aminosäure-Bibliothek mit einer Probe der Substanz, die mit Lamifiban bis auf eine Methylengruppe am Carboxyterminus identisch ist (**Figur 44**) und die unter identischen Bedingungen auf dem Harz hergestellt wurde, zeigt **Graphik 10**.



Figur 44. Strukturen der aktiven Substanzen aus Bibliothek E mit Lamifibanähnlicher Verbindung auf Festphase



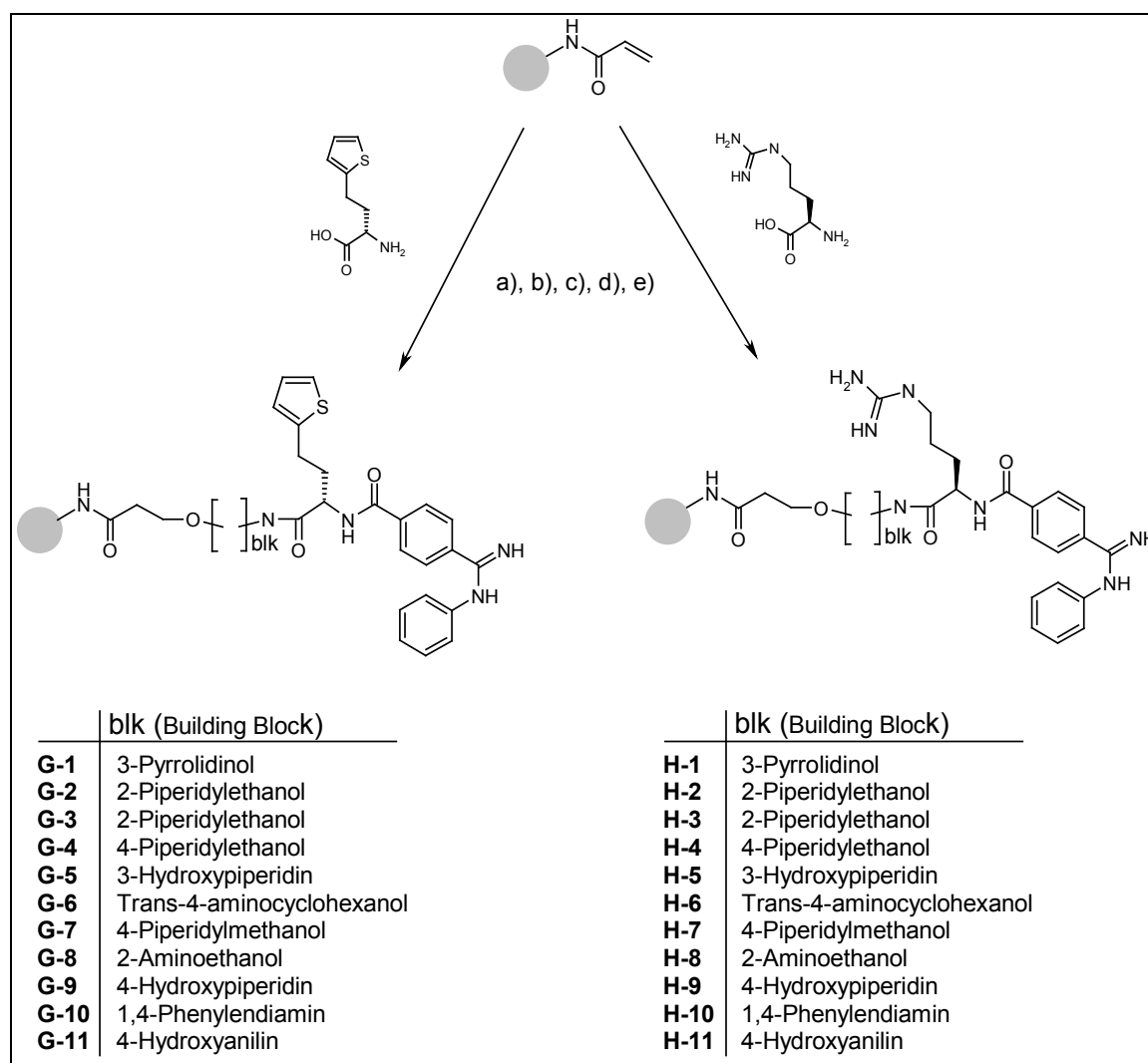
Graphik 10. Vergleich einiger Substanzen der Amidinbibliothek mit Lamifiban auf PEGA

Bis auf eine Unregelmässigkeit, die jedoch innerhalb der Standardabweichung liegt, ist die Reihenfolge der Aktivitäten wie erwartet, wobei die identifizierte Verbindung **E-24** im Screening mit dem monoklonalen Antikörper sogar eine noch höhere Aktivität zeigt als die Probe mit der Lamifiban-ähnlichen Verbindung **98**.

Es darf angenommen werden, dass man durch die Variation der Aminosäuren, das Screening und die nachfolgende Auswertung der Leuchtaktivitäten in dieser Bibliothek die zuverlässigsten Informationen über die Aktivitäten der Aminosäurebausteine im relativen Vergleich erhält, da für alle Varianten das gleiche Harz mit identischer Vorgeschichte verwendet wurde und Peptidkopplungen alle mit einer sehr guten Kopplungsausbeute von normalerweise > 95 % ablaufen. Nach der Kopplung der Aminosäuren wurde das Harz aller Varianten wiederum den gleichen Reaktionsbedingungen ausgesetzt, die Beladung an relevanter Substanz auf dem Harz ist also in allen Variationen der **Bibliotheken E und F** etwa gleich gross.

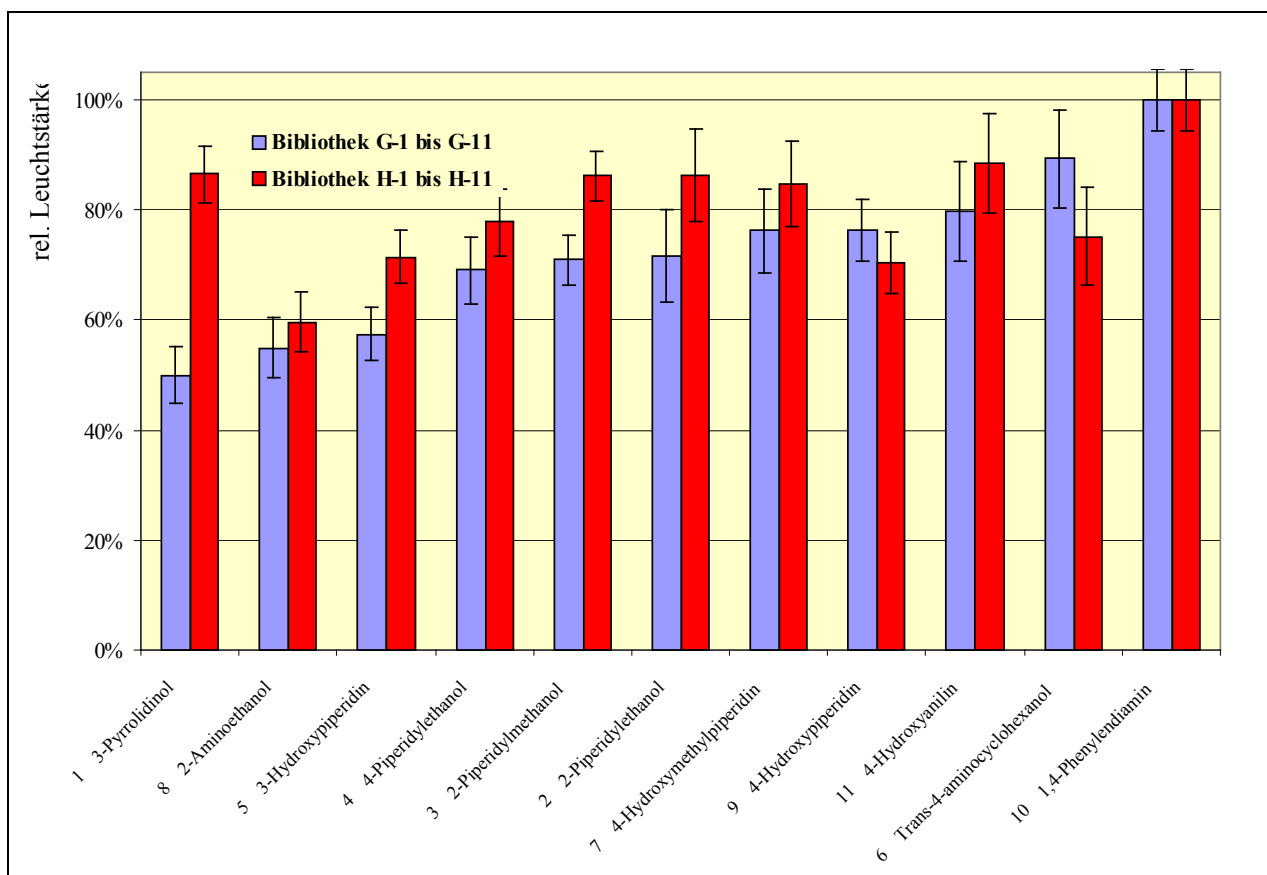
7.5.3 Optimierung des Aminoalkohol-Bausteins

Die weitere Optimierung des Gerüsts wurde wiederum mit den beiden aktivsten Verbindungen aus dem vorherigen Screening, **E-24** mit L-Thienylalanin und **E-21** mit D-Arginin, weitergeführt. Parallel wurde mit 10 verschiedenen N-Boc-geschützten Aminoalkoholen (**Tabelle 17**) eine Michael-Addition an das Acrylamid durchgeführt, wobei die Bibliothek dann geteilt wurde und jeweils mit L-Thienylalanin zu **G-1** bis **G-11** und mit D-Arginin zu **H-1** bis **H-11** weitergeführt wurde (**Schema 32**). Nach jedem Schritt der Synthese wurde von jeder Probe ein ATR-IR-Spektrum aufgenommen, um das Fortschreiten der Synthesesequenz zu verfolgen. Die Umsätze können zwar nicht quantifiziert werden, sie bewegen sich aber alle im gleichen Rahmen.

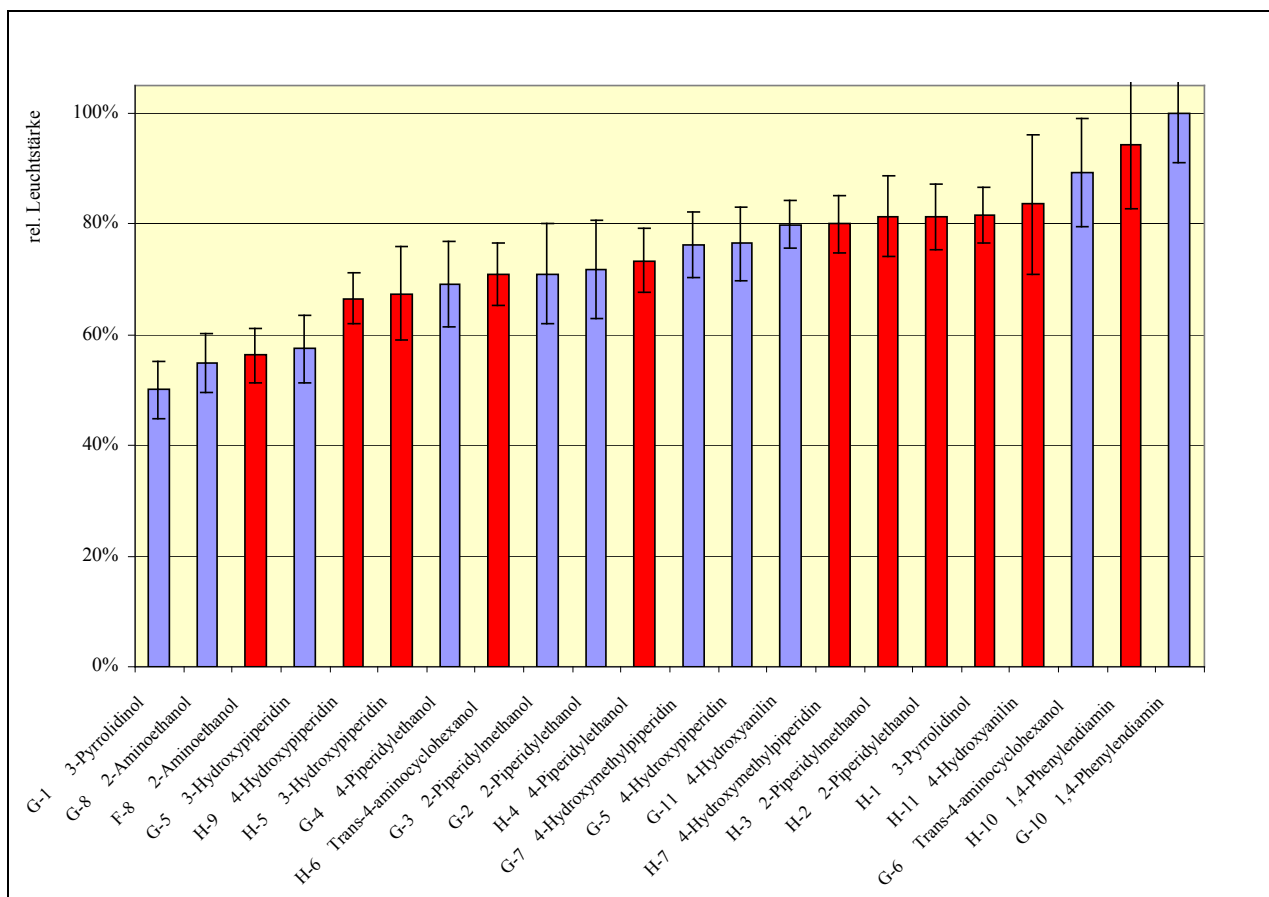


Schema 32. Optimierung des Aminoalkoholbausteins zu den **Bibliotheken G** und **F**: a) Diamin oder N-Boc-Aminoalkohole, THF, LDA, 50°C, 20 h; b) TFA, H₂O, TIPS, 1 h, RT; c) **G**: L-Thienylalanin, HATU, DIPEA, NMP, 2 h, RT; 20 % Piperidin, 5 Min.; **H**: D-Arginin, HATU, DIPEA, NMP, 2 h, RT; 20 % Piperidin, 5 Min.; d) 4-Cyanobenzoesäure, HATU, DIPEA, NMP, 2 h, RT; e) HCl/EtOEt/EtOH, 2 h, RT; Anilin/EtOH, RT

Die Resultate des nachfolgenden Screenings dieser beiden Bibliotheken sind in **Graphik 11** dargestellt: Die Resultate sind einerseits geordnet nach Aktivitäten der **Bibliothek G** mit L-Thienylalanin (**E-24**) als Aminosäurekomponente, andererseits nach Aktivitäten aller Verbindungen der **Bibliotheken G** und **H**. Zudem sind die Standardabweichungen angegeben, die normalerweise wiederum ca. 10 % betragen.



- a) Die Leuchtintensitäten sind nach steigender Aktivität der Werte der **Bibliothek G** (mit L-Thienylalanin) geordnet, wobei die Intensitäten für beide Bibliotheken auf 100 % normiert sind.



b) Die Leuchtintensitäten sind nach steigender Aktivität aller Verbindungen aus den **Bibliotheken G** und **H** geordnet, wobei die Intensitäten über beide Bibliotheken auf 100 % normiert sind.

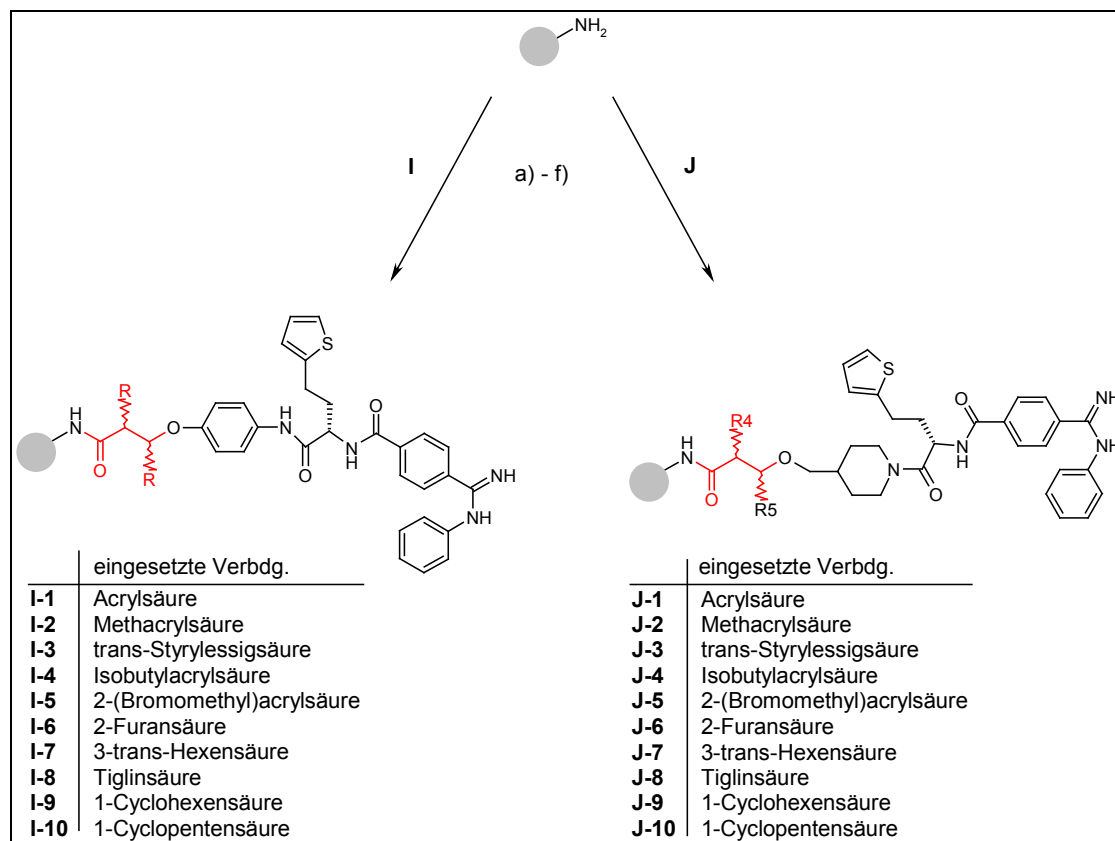
Graphik 11. Resultate des Screenings der **Bibliotheken G** und **H** mit den Variationen der Aminoalkohol-Bausteine: a) nach steigender Aktivität der Serie mit L-Thienylalanin geordnet und b) nach steigender Aktivität aller Verbindungen geordnet.

Die aktivste Probe, die gleich in beiden Serien gefunden wurde, ist diejenige mit 1,4-Phenylendiamin (**G-10**), wobei dies die einzige Diaminoverbindung neben zehn Aminoalkoholen ist. Die nächstbeste Probe ist die, bei der trans-4-Aminocyclohexanol verwendet wurde (**G-6**), jedoch nur die Variante mit L-Thienylalanin als nachfolgende Aminosäure. Interessanterweise folgt dann der zweite aromatische Baustein 4-Hydroxyanilin (**G-11**), gefolgt vom im Originalmolekül verwendeten 4-Hydroxypiperidin (**G-9**) und ungefähr gleich aktiv 4-Hydroxymethylpiperidin (**G-7**). Auffallend bei dieser Analyse ist, dass unter den aktivsten Verbindungen bevorzugt die 1,4- oder para-substituierten Bausteine sowie die aromatischen Bausteine auftauchen, was wiederum den Bindungsmodus, der ähnlich der Originalverbindung sein müsste, bestätigt.

Verglichen mit der Variation der Aminosäuren fällt bei dieser Bibliothek auf, dass die Unterschiede in den relativen Leuchtstärken zwischen den verwendeten Edukten nicht mehr so gross sind und die Werte mit den Standardabweichungen fast im ganzen Bereich überlappen. Eine mögliche Erklärung kann sein, dass mit zunehmender Nähe zum Harz die Variationen des Gerüsts an Einfluss auf die Bindungsstärke verlieren, da die Substanzen für den monoklonalen Antikörper durch dessen sterische Hinderung nicht mehr so gut zugänglich sind.

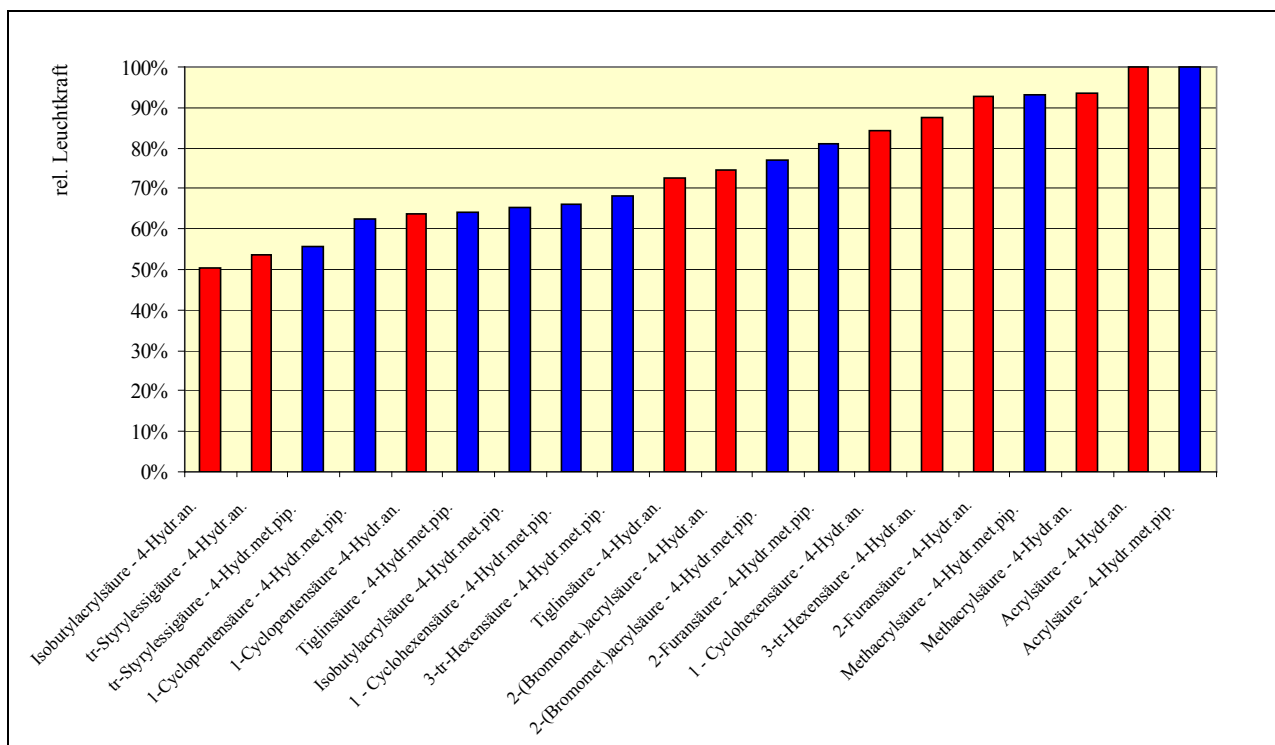
7.5.4 Optimierung des Acrylsäure-Bausteins

Die beiden Varianten mit 4-Hydroxyanilin (**G-11**) und 4-Hydroxymethylpiperidin (**G-7**) wurden zur weiteren Optimierung des Gerüsts, nun des Acrylbausteins, verwendet (**Schema 33**). Als Bausteine wurden die 10 Verbindungen aus **Tabelle 16** eingesetzt.

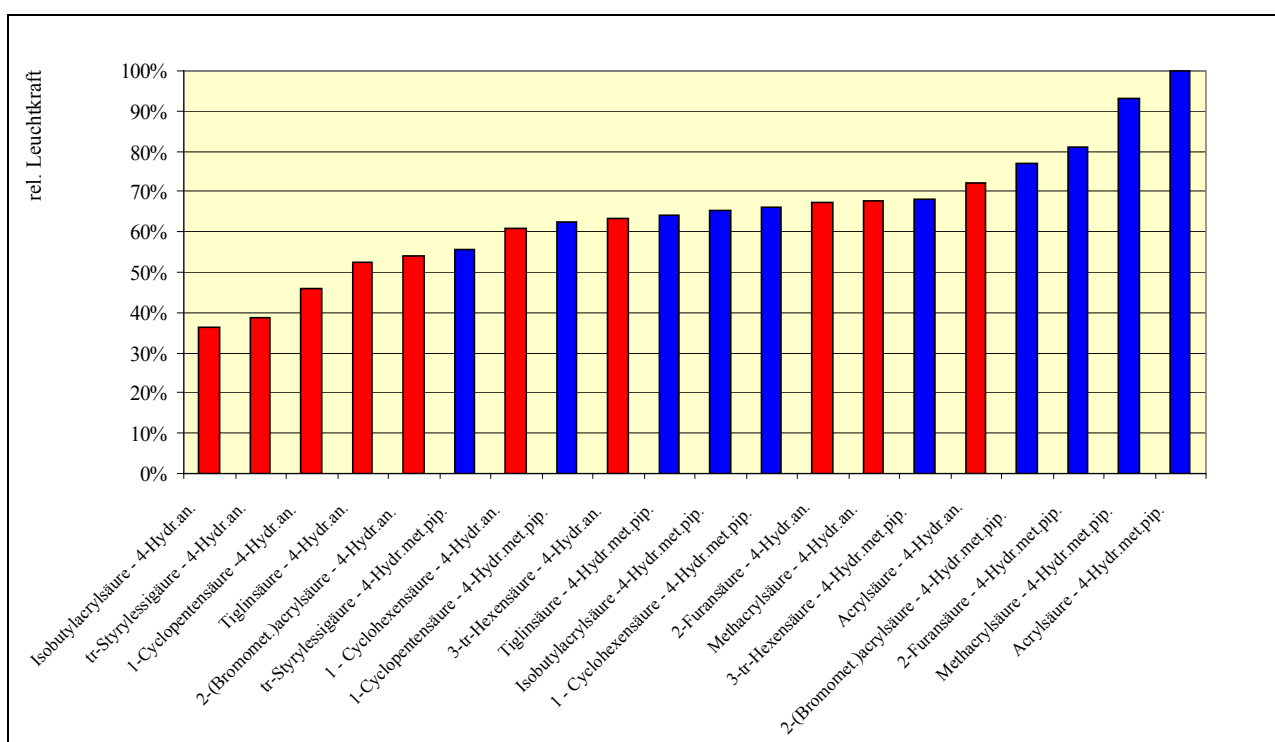


Schema 33. Optimierung des Acrylbausteins: a) Acrylsäure, HATU, DIPEA, NMP, 2 h, RT; b) I: N-Boc-4-Hydroxyanilin, THF, LDA, 50°C, 2 h; J: N-Boc-4-Hydroxymethylpiperidin, THF, LDA, 50°C, 2 h; c) TFA, H₂O, TIPS 1 h, RT; d) : L-Thienylalanin, HATU, DIPEA, NMP, 2 h, RT; 20 % Piperidin, 5 Min.; e) 4-Cyanobenzoessäure, HATU, DIPEA, NMP, 2 h, RT; f) HCl/EtOEt/EtOH, 2 h, RT; Anilin/EtOH, RT

Die Proben wurden wie zuvor gegen den anti-Lamifiban-mAB LMF-2 gescreent, wobei in diesem Schritt von jeder Probe nur zwei Fotos gemacht wurden, und je 10 Beads fotografiert und ausgemessen wurden. Die Resultate des Screenings sind in **Graphik 12** dargestellt. Die Resultate sind auf zwei verschiedene Arten dargestellt, a) jede Serie auf 100 % normiert und b) alle Resultate zusammen auf 100 % normiert.



a) Beide Serien des Screenings der 4. Bibliothek sind zur besseren Vergleichbarkeit je auf 100 % normiert dargestellt.



b) Alle Resultate des Screenings der 4. Bibliothek sind auf 100 % normiert dargestellt.

Graphik 12. Darstellung der Screeningresultate der 4. Bibliothek, die Optimierung des Acrylsäurebausteins.

Aus dem Screening geht hervor, dass eine unsubstituierte oder wenig substituierte Variante des Carboxyterminus am aktivsten gegenüber dem mAB ist. Bei beiden Serien sind die beiden aktivsten Acrylbausteine einerseits die unsubstituierte Acrylsäure und andererseits die am α -Kohlenstoff methylsubstituierte Methacrylsäure. Auch bei dieser Variation der Acrylbausteine stimmt die Beobachtung aus dem Screening mit der Tatsache überein, dass der mAB spezifisch den unsubstituierten C-Terminus der Piperidinyloxyessigsäure von Lamifiban erkennt.

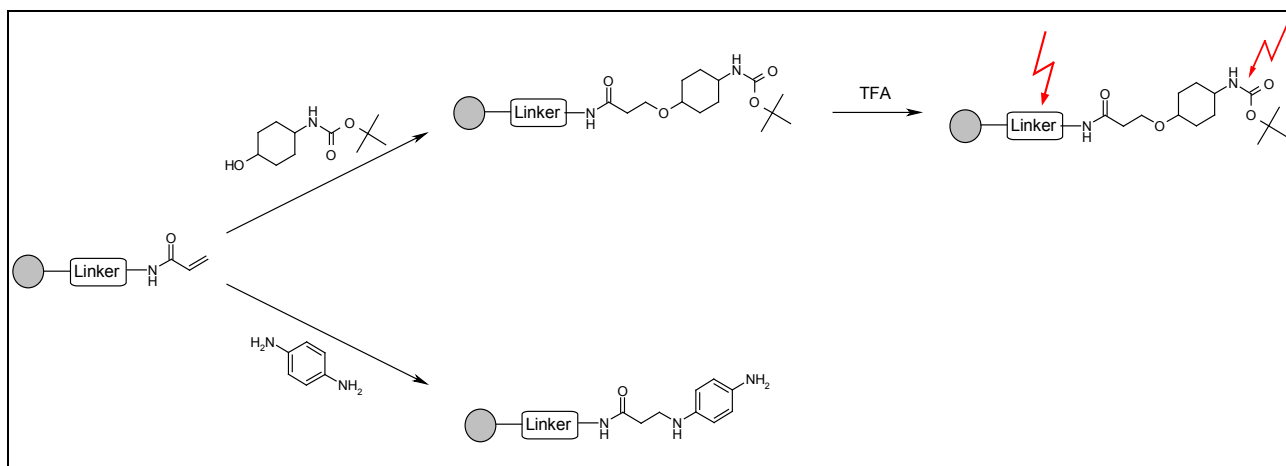
7.6 Überprüfung der Resultate des Festphasenscreenings

Zur Überprüfung der Richtigkeit der Resultate, ob die herausgefundenen Verbindungen tatsächlich eine Aktivität gegenüber dem mAB zeigen und ob die Abstufungen, die im „On-Bead-Assay“ deutlich wurden nicht durch unspezifische Wechselwirkungen oder statistische Fehler zustande kamen, wurden einige Verbindungen aus den Bibliotheken herausgesucht und in grösserem Masstab hergestellt, sodass sie mittels Bindungsstudien gegenüber dem mAB mittels eines BiaCore-Gerätes untersucht werden konnten.

7.6.1 Selektion und Synthese einiger Verbindungen für weitere Untersuchungen

Für eine weitere Untersuchung mittels BiaCore wurden aus Zeitgründen Verbindungen gewählt, die sich leicht synthetisieren lassen und relativ gute Ausbeuten liefern. Von allen Bausteinen wurden die aktivsten Variationen gewählt, sowie einige der weniger aktiven Variationen der Aminosäurebausteine, um festzustellen, ob die mit dem Antikörper-Assay auf den Beads beobachteten Abstufungen in der Aktivität sich auch quantitativ nachweisen lassen. Da bei der Optimierung der Acrylkomponenten die unsubstituierte Acrylsäure **I-1** / **J-1** und bei der Optimierung der Aminoalkohol-/Diaminkomponenten 4-Aminoanilin **G-10** / **H-10** am aktivsten waren, wurden diese beiden Komponenten eingesetzt und nur die Aminosäuren, sowie die Nitrilbenzoesäuren variiert. Einige Punkte, die bei der Synthese der Verbindungen beachtet werden mussten, waren die Folgenden:

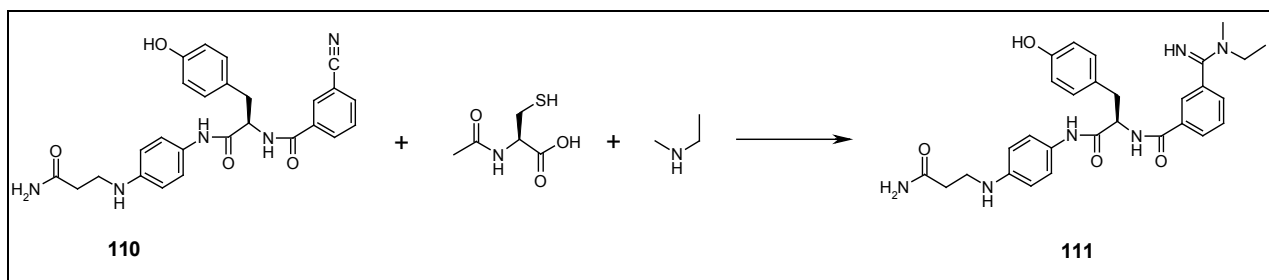
- Da für die Synthese auf Festphase eine grössere Harzmenge benötigt wurde, musste aus Kostengründen ein anderes Harz mit einem anderen Linker verwendet werden. Die kommerziell erhältlichen und einfach zu handhabenden Linker sind aber säurelabil und werden unter den sauren Bedingungen für eine Boc-Entschützung, welche beim Einsatz von N-Boc-geschützten Aminoalkoholen nötig gewesen wären, abgespalten. Andererseits kann aber 4-Aminoanilin ohne Probleme ungeschützt eingesetzt werden (**Schema 34**).



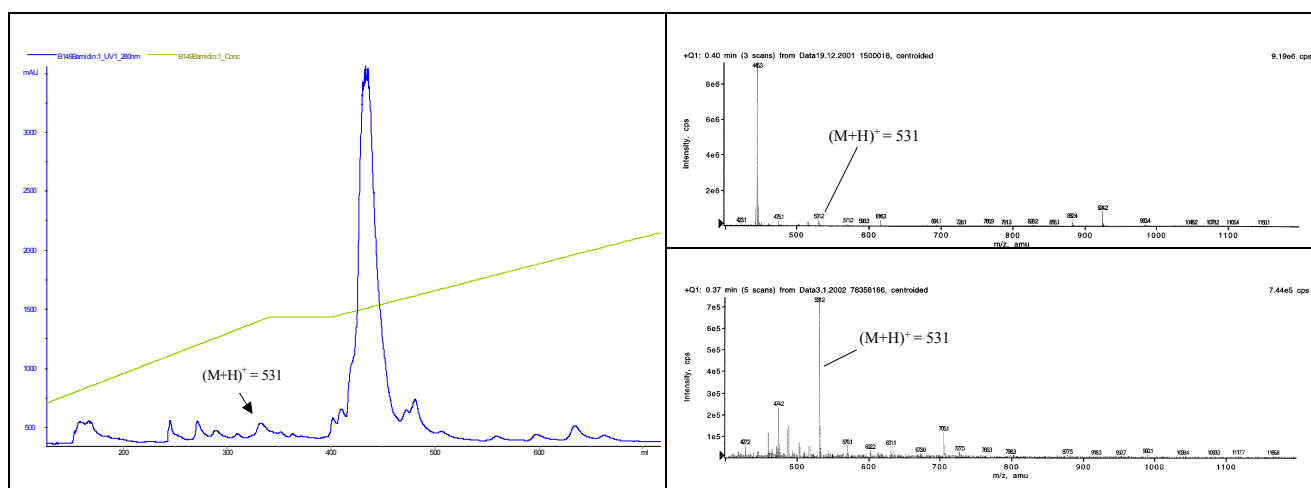
Schema 34. Neu auftretendes Problem bei der Synthese eines grösseren Ansatzes auf Festphase: Linkerspaltung schon nach der ersten Stufe der Synthesesequenz mit einem N-Boc-geschützten Aminoalkohol und problemlose Synthese mit einem ungeschützten symmetrischen Diamin.

- Weil beim Screening der Verbindungen das endständige Carboxylat als Ankergruppe am Harz dient und für eine Bindung an den mAB nicht zur Verfügung steht, wurde für die Festphasensynthese ein Rink-Amidharz gewählt, welches nach Abspaltung der Verbindungen zum Amid führt. Um auch Verbindungen mit einer Carboxygruppe wie das Originalmolekül zu erhalten, wurde ein sauer (TFA) spaltbares Wang-Hydroxy-Harz gewählt. Parallel dazu wurden in Lösung Substanzen synthetisiert, welche am Carboxyende einen Ethylester aufweisen und die wahrscheinlich die harzgebundenen Substanzen, wie der mAB sie „sieht“, besser repräsentieren als ein freies Amid oder eine freie Säure.

In einem ersten Schritt wurde die Acrylsäure ans Harz gekoppelt. An diese wurde dann in saurem Medium 4-Aminoanilin michaelartig addiert. Danach wurde eine Fmoc-geschützte Aminosäure an den freien Anilinteil gekoppelt, das Amin entschützt und die Cyanbenzoesäure an das freie Amin gekoppelt. Die Verbindungen wurden auf dieser Stufe mit TFA vom Harz abgespalten, unter gleichzeitiger Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen (**Schema 36**). Da eine Pinnerreaktion zur partiellen Spaltung des säurelabilen Rink-Linkers führte, sollte die Reduktion des Nitrils zum Amidin später in Lösung erfolgen. Bei der Pinnerreaktion in Lösung traten jedoch wiederum Probleme auf: Bei gleichen Reaktionsbedingungen (2 h, HCl/EtOEt/EtOH, RT) wie auf dem Harz, konnte kein Umsatz (HPLC, MS, IR) festgestellt werden, die Nitrilgruppe blieb unverändert. Bei längeren Reaktionsbedingungen konnte nur eine Hydrolyse der Amin- und Amidgruppen festgestellt werden (MS). Deshalb wurde versucht, mit der modifizierten Thioamiditmethode b) in **Schema 19**, das Amidin **111** herzustellen (**Schema 35**). Aber auch bei dieser Methode war im MS des Reaktionsgemisches nur ein geringer Umsatz beobachtbar. Nach chromatographischer Reinigung und MS-Analyse der Fraktionen, konnte der gewünschte Peak aber isoliert und identifiziert werden (**Figur 45**). Gemäss einer späteren MS-Analyse war jedoch kein Amidin mehr vorhanden, nur noch Edukt **110**.



Schema 35. Pinnerartige Reaktion vom Nitril zum Amidin

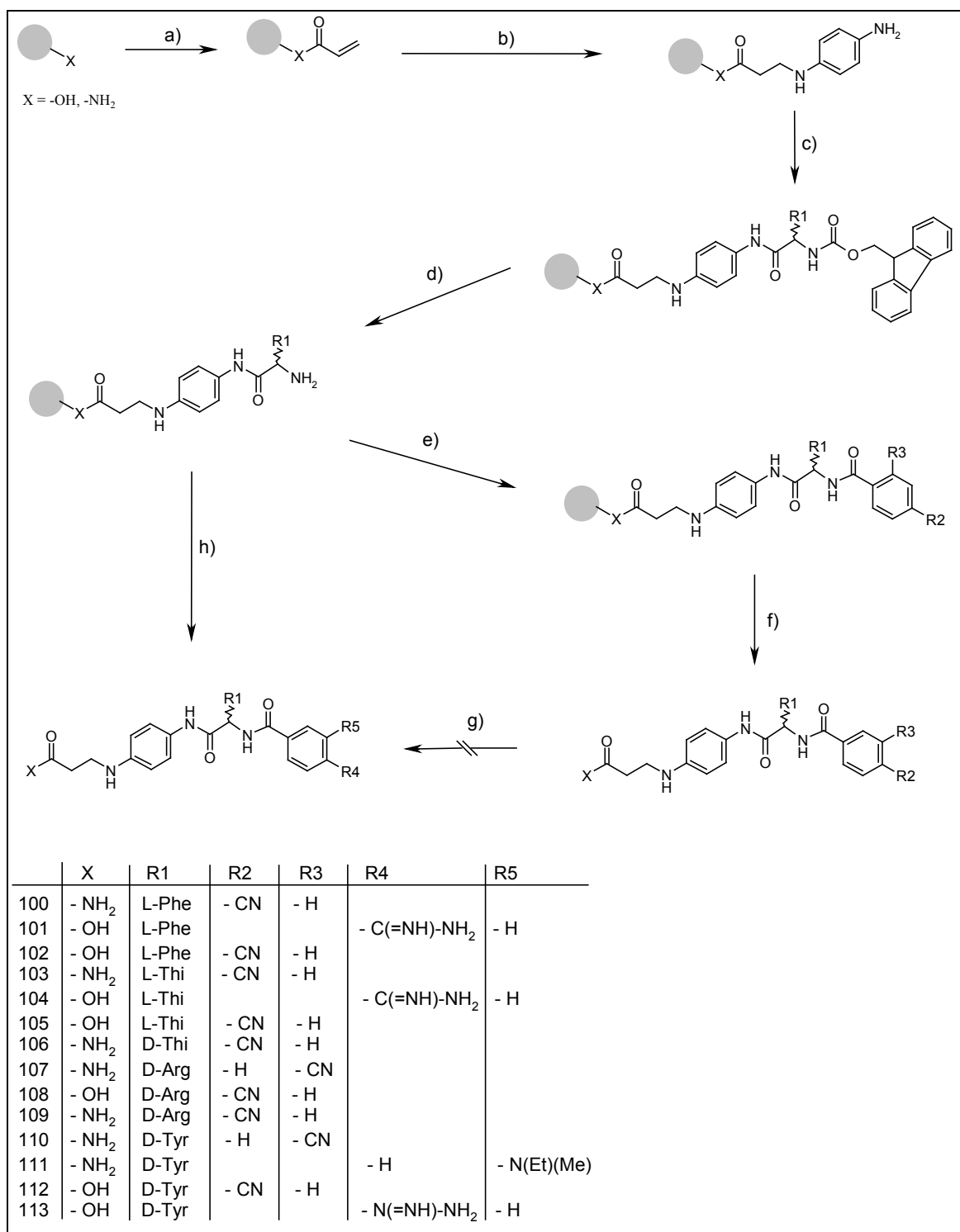


Figur 45. MS-Spektren (rechts) des Reaktionsgemisches (oben) und des isolierten Peaks (unten) aus der chromatographischen Reinigung (links) über Source-Material.

Da die Synthese des Amidins nicht wie gewünscht funktioniert hat, wurde noch versucht, nach der Kopplung der verschiedenen Aminosäuren den „Originalbaustein“ aus Lamifiban, 4-Amidinobenzoessäure, zu koppeln (**101**, **104**, **113**)¹⁵⁵. Die Produkte wurden wiederum mit TFA abgespalten. Erstaunlicherweise funktionierte die Ausfällung durch Zugabe von Diethylether jedoch nicht und die Produkte mussten chromatographisch gereinigt werden. Durch MS-Messungen des Reaktionsgemisches und der Säulenfraktionen wurde aber festgestellt, dass die Benzamidine instabil sind und durch den Verlust von $[NH_3]$ zu den Nitrilen zurückreagieren (**Schema 38**). Aus der Literatur ist bekannt, dass Benzamidine nicht sehr stabil sind, dies wird aber nur für basische Lösungen erwähnt¹⁴¹.

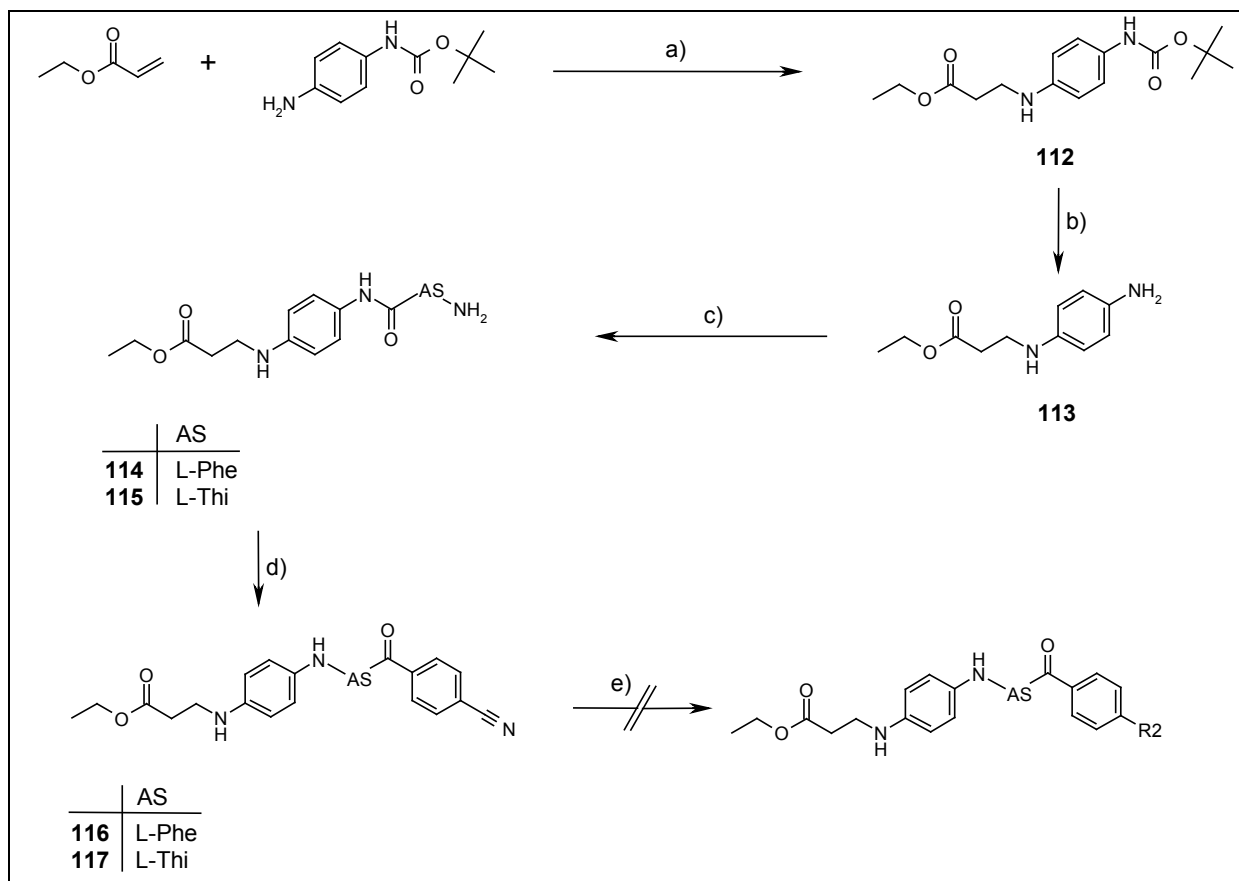
Ein weiteres Problem stellte die Synthesesequenz am Wang-Harz dar. Die Ausbeuten betrugen auf diesem Harz nur 5 – 20 %, was wahrscheinlich an der Michael-Addition liegt, die in 50 % CH_3COOH durchgeführt wurde und den Linker spaltet.

Die Synthesesequenz und verschiedene Modifikationen, die mittels einer Kombination aus Fest- und Flüssigphase hergestellt wurden, sind in **Schema 36** dargestellt. Wegen den erwähnten Problemen mit der Synthese konnten keine reinen Amidine hergestellt werden, die bis zu einer weiteren Messung stabil blieben.



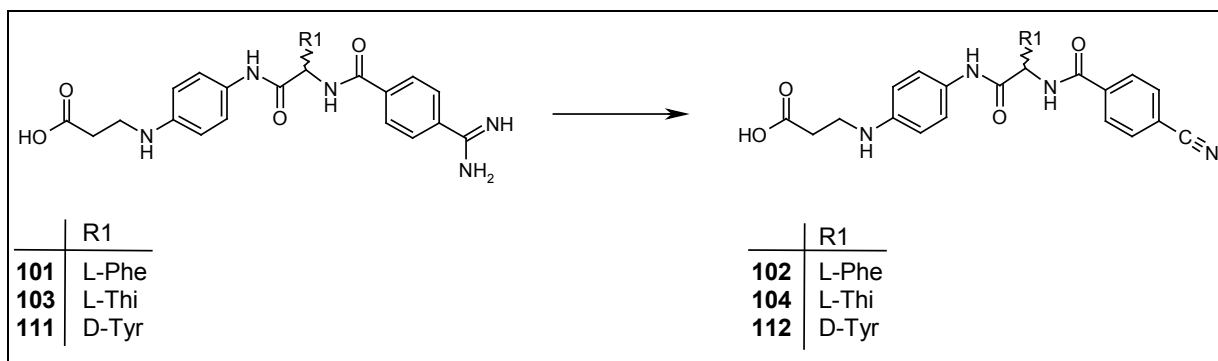
Schema 36. Syntheschema der ausgesuchten Verbindungen auf Tentagel mit Rink-Amid-Linker oder Wang-Hydroxy-Harz: a) TPTU, Acrylsäure, DIPEA, RT, 5 h; b) 4-Aminoanilin, CH₃COOH, 70°C, 20 h; c) Fmoc-Aminosäure, TPTU, DIPEA, RT, 5 h; d) 20 % Piperidin in NMP; e) (subst.) Cyanobenzoesäure, TPTU, DIPEA, RT, 5 h; f) i. 50 % TFA in CH₂Cl₂, 1 h, ii. Diethylether; g) N-Acetylcystein, NH₄OAc, 50°C (führt zur fast vollständigen Hydrolyse); h) HATU, DIPEA, 4-Amidinobenzoesäure, NMP, RT, 1 h.

Die Synthesesequenz für die Substanzen, die in Lösung synthetisiert wurden, ist in **Schema 37** dargestellt. Auch diese Nitrile konnten mittels Pinner-Methode nicht ins Amidin überführt werden, da das Molekül hydrolysiert wurde.



Schema 37. Syntheschema für die Synthese in Lösung der ausgesuchten Verbindungen: a) CH_3COOH , 20 h, 70°C ; b) 50 % TFA in CH_2Cl_2 , 2 h, RT; c) i: Fmoc-Aminosäure, TPTU, DIPEA, RT, 2 h; ii: 20 % Piperidin in NMP; d) (subst.) Cyanobenzoesäure, TPTU, DIPEA, RT, 2 h; e) Pinnerreaktion führt zur Hydrolyse

Die Erkenntnisse aus dieser Synthesesequenz zeigen, dass Reaktionen von verschiedenen Harztypen nicht ohne weiteres auf ein anderes Harz übertragbar sind, sei dies wegen kinetischer Effekte, welche von der Harzstruktur ausgehen oder wegen der Linkertechnik, die im betreffenden Fall Verwendung findet. Schliesslich zeigte sich, dass das gewünschte Produkt auch nach einer kombinierten Synthesesequenz aus Lösungssynthese und Festphasensynthese auf dem eingeschlagenen Weg nicht herzustellen war. Auch nach Weglassen der Variation der Amidinobenzoesäure und Kopplung von 4-Amidinobenzoesäure direkt auf dem Harz ¹⁵⁵ konnte das Produkt nicht isoliert werden, da es während der chromatographischen Reinigung zum Benzonitril zurückreagierte (**Schema 38**) und spontan NH_3 verlor.



Schema 38. Spontane Rückreaktion der entstandenen Benzamidine zu Benzonitrilen während der Chromatographie

7.6.2 Messung der Affinitätskonstanten der nachsynthetisierten Verbindungen gegenüber dem mAB mittels BiaCore

Aus Zeitgründen war es nicht möglich, die Reduktion der Nitrile in Lösung weiter zu optimieren und die Nitrile in die korrespondierenden Amidine überzuführen. So wurden die Substanzen, die nur eine Nitrilfunktion anstelle der Amidinfunktion enthielten, mittels BiaCore gegen den mAB getestet, in der Hoffnung, dass innerhalb der Substanzen immerhin gewisse Abstufungen oder Tendenzen im Bindungsverhalten ausgemacht werden können, die die Resultate des Screenings auf den Festphasenbeads bestätigen.

Die Resultate der Messungen mit BiaCore sind in (**Tabelle 27**) dargestellt.

| Verbindung | C _{max} (μM) | C _{max} (μM) | K _D |
|------------|-----------------------|-----------------------|----------------|
| 116 | | 10 | a) |
| 117 | | 10 | a) |
| 100 | | 100 | a) |
| 103 | | 900 | b) |

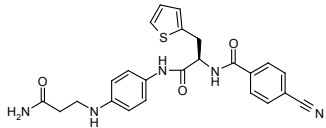
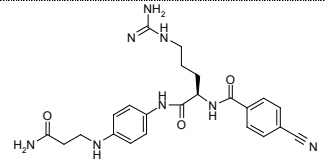
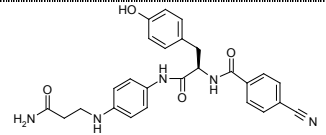
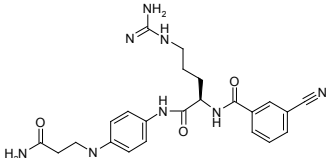
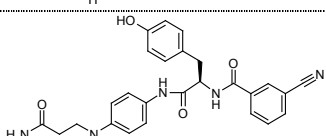
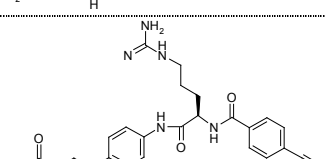
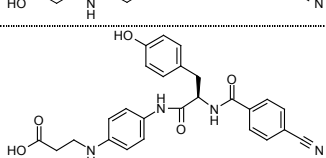
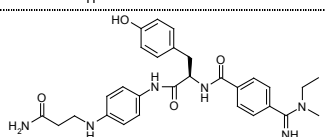
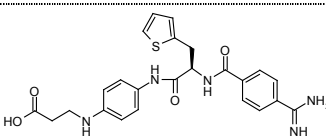
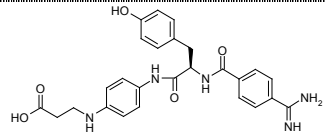
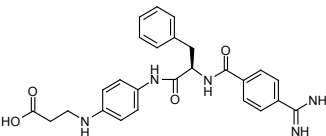
| | | | |
|---|---|-----|-------|
| 106 |  | 100 | a) |
| 109 |  | 900 | ~ 350 |
| 111 |  | 900 | b) |
| 107 |  | 900 | ~ 527 |
| 110 |  | 900 | a) |
| 108 |  | 900 | a) |
| 112 |  | 100 | a) |
| 111 (→ 112) |  | 100 | a) |
| 105 |  | 500 | a) |
| 113 |  | 500 | a) |
| 102 |  | 500 | a) |
| a) keine spezifische Bindung beobachtet b) spezifische Bindung, jedoch zu schwach um K _D -Wert zu bestimmen | | | |

Tabelle 27. Resultate der Bindungsstudien am anti-Lamifiban LMF-2 Antikörper. Zur Untersuchung von spez./unspez. Binden wurden die Substanzen gleichzeitig an einem anti-Amyloid Antikörper (BAP-1) untersucht. Die C_{max}-Werte geben die Löslichkeitsgrenze der Verbindungen an.

Aus den Resultaten können nicht sehr viele Rückschlüsse gezogen werden. Die Substanzen sind allesamt schwerlöslich, sodass nicht alle bis zur gleichen Konzentration gemessen werden konnten, oder sie binden nur sehr schwach am Antikörper.

Die beiden Substanzen, für die ein K_D -Wert bestimmt werden konnte, sind solche, mit Arginin als Aminosäurebaustein. Die aktivere der beiden hat die Nitrilgruppe in para-, die weniger aktive in meta-Stellung. Weitere Substanzen, die auch spezifisch an LMF-2 bindet, sind diejenige mit D-Tyrosin und L-Thienylalanin als Aminosäurebausteine.

Diese Resultate stimmen mit den Screeningresultaten insofern überein, dass die Verbindungen mit D-Arginin tatsächlich aktiver war als diejenigen mit D-Tyrosin (vgl. **Graphik 9**). Hingegen zeigten im Screening die Verbindungen mit L-Thienylalanin eine noch höhere Affinität, was mit der BiaCore-Messung widerlegt wird. Diese zeigt zwar eine spezifische Bindung, ist aber zu schwach, um bestimmt zu werden. Leider sind die anderen interessanten Verbindungen mit L-Phenylalanin und D-Thienylalanin als Aminosäurebausteine zu schwerlöslich, um Messwerte zu erhalten.

Ein weiterer Punkt der BiaCore-Messung, der mit dem Festphasenscreening übereinstimmt, ist die Abstufung bezüglich der Nitrilsubstitution am Aromaten. Wie in **Graphik 7** sichtbar ist, sind die Verbindungen, in denen 4-Cyanobenzoessäure eingesetzt wurde, grösstenteils aktiver als diejenigen mit 3-Cyanobenzoessäure.

8. Fazit und Ausblick

Das Screening neuer Substanzen und Wirkstoffe gegen ihr biologisches Zielmolekül ist ein schwieriges und aufwendiges Unterfangen. Im allgemeinen steht die Entwicklung eines geeigneten Assaysystems im Vordergrund. Dies birgt aber verschiedene Probleme. Ein Hauptproblem stellt dabei das biologische Zielmolekül selbst dar. Ist dieses nur schwer verfügbar, nicht isolierbar oder in Lösung nicht stabil, kann dies die Assayentwicklung erheblich erschweren.

Der in dieser Arbeit vorgestellte Ansatz, einen Wirkstoff-Rezeptor gegen einen monoklonalen Antikörper zu ersetzen, könnte diesen Vorgang wesentlich vereinfachen. Anstelle der vielleicht aufwendigen Isolation oder Modifikation durch Oberflächenmutation eines Proteins/Enzyms, wird gegen ein bekanntes natürliches oder künstliches Substrat des biologischen Zielmoleküls ein oder mehrere monoklonale Antikörper erzeugt, die man fluoreszenzmarkiert und als Screening-Werkzeug für Substanzbibliotheken benützen kann. Als Untersuchungsobjekte wurden der GPIIb/IIIa-Rezeptor und ein monoklonaler Antikörper gegen Lamifiban, einen GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten, herangezogen. Dieses System bot sich an, da auf diesem Gebiet schon viel Arbeit geleistet worden ist und ein monoklonaler Antikörper gegen einen sehr potenten GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten verfügbar war.

Aufgrund eines statistischen Vergleichstestes mit bekannten Verbindungen aus dem Lamifiban/GPIIb/IIIa-Projekt erhielt man grundsätzlich ermutigende Resultate. Das Prinzip funktioniert und monoklonale anti-Lamifiban mAB's scheinen Verbindungen in derselben Weise zu erkennen/diskriminieren wie der Rezeptor dies tut. Natürlich erhält man mit dem Antikörpertest keine absoluten Werte, sondern nur relative Aktivitäten der Verbindungen zueinander.

Bei der Anwendung der Methode zur Identifizierung von weiteren aktiven Verbindungen anhand von peptidischen und nicht-peptidischen Bibliotheken auf Festphase traten jedoch einige Probleme auf. Die Verbindungen auf den Beads, die identifiziert und nachsynthetisiert wurden, zeigen nur eine sehr schwache Affinität gegenüber dem Antikörper. Im Falle der Peptide lag dies einerseits an einem nicht optimierten „Single-Bead“-Assay für Split&Mix-Bibliotheken, im Falle der Peptidmimetika andererseits lag es an den schwankenden Qualitäten der mehrstufigen Reaktionssequenzen und an Problemen mit der Synthese und der Isolation der Substanzen in grösserem Massstab.

Für zukünftige erfolgreiche Anwendungen der Screeningmethode mittels monoklonalen Antikörpern lassen sich daraus folgende Schlüsse ziehen:

- Es sollten nur Synthesesequenzen mit sehr guten Ausbeuten, vergleichbar mit Peptidsynthesen synthetisiert und gescreent werden.
- Für strukturell ähnliche Verbindungsbibliotheken ergibt eine statistische Auswertung von Parallelbibliotheken zuverlässigere Resultate der Verbindungen relativ zueinander als die Auswertung per „Single-Bead“-Analyse. Der Ansatz ist ungleich aufwendiger, könnte aber auch automatisiert werden.
- Eine „Single-Bead“-Analyse empfiehlt sich nicht, da die Streuungen/Inhomogenitäten innerhalb gleicher Beadsorten zu gross sind und die erhaltenen Aktivitäten (Leuchtintensitäten) zwischen Beads mit ähnlichen Verbindungen zu wenig variieren.

Für zukünftige Anwendungen und Untersuchungen eröffnen sich dabei natürlich auch andere Möglichkeiten:

- Es wäre interessant, eine Untersuchung von verschiedenen Inhibitoren an anderen Rezeptoren durchzuführen, um das Konzept anhand anderer Beispielen/Systeme zu untermauern.

- Eine Untersuchung von Substanzbibliotheken mit jeweils zwei oder mehreren monoklonalen Antikörpern wäre interessant, um mehr Informationen über Präferenzen, Bindungsverhalten oder Fehlerquellen von Antikörpern als Rezeptorersatz zu erhalten.
- Für eher quantitative Affinitätsmessungen von Verbindungen nicht auf Festphase könnten monoklonale Antikörper auch als Rezeptorersatz in bestehenden Assaysystemen wie ELISA oder wie es in dieser Arbeit schon durchgeführt wurde, als immobilisierte Phase in BiaCore-Messungen verwendet werden.

Der in einem weiteren Teil der Arbeit entwickelte Disulfidlinker für die Festphasen-Peptidsynthese bietet eine Alternative zu den bisher verwendeten Linkern in der Peptidsynthese. Der Linker ist, anders als die meisten SPPS-Linker, unter reduktiven bzw. schwach basischen Bedingungen spaltbar und liefert sehr saubere Abspaltungsprodukte. Für die standardmässige Synthese von Peptiden nach dem Fmoc-Syntheseprotokoll ist das Disulfid-Linkersystem bestens geeignet, da es einerseits stabil gegenüber den leicht basischen Abspaltungsbedingungen der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe, andererseits stabil gegen die sauren Abspaltbedingungen der Seitenkettenschutzgruppen ist. Demzufolge kann bei einer Spaltung vom Harz nur das entschützte Peptid abgespalten werden, ohne Kontaminationen mit Seitenkettenschutzgruppen, „Scavengern“ und TFA. Auch verschiedene „Single-Bead“-Analysen von Tetra- bis Heptapeptiden mittels Tandem-MS der Spatlösung konnten erfolgreich durchgeführt werden. Ohne weitere Softwareunterstützung war die Identifizierung und Sequenzbestimmung von mehreren Peptiden möglich.

Der Einsatz des Linkers in der Peptidchemie wird nur insofern eingeschränkt, als dass kein Cystein eingesetzt werden kann, da dies die Synthese empfindlich stört. Der Mechanismus, wie Cystein mit dem Linker wechselwirkt, konnte nicht eruiert werden.

9. Experimentelles

9.1 Allgemeine Bemerkungen

9.2 Abkürzungen:

| | |
|-----------------|---|
| ACN: | Acetonitril |
| ATR: | Attenuated Total Reflection |
| Boc: | tert-Butyloxycarbonyl |
| DCC: | N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid |
| DEAC: | Diethylazadicarboxylat |
| DIPEA: | Diisopropylethylamin (Hünig Base) |
| DMAP: | Dimethylaminopyridin |
| DMT-Cl: | Dimethoxytritylchlorid |
| EE: | Essigsäureethylester |
| Fmoc: | 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl |
| HATU: | O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat |
| HOAt: | (1-Hydroxy-7-azabenzotriazole) |
| ISP-MS: | Ionenspray-Massenspektrometrie |
| NMP: | N-Methyl-Pyrrolidinon |
| PBS: | Phosphatpuffer |
| Pmc: | 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl |
| Rink-Amid-Harz: | 4-(2',4'-Dimethoxyphenylaminomethyl)phenoxymethyl-Harz |
| RT: | Raumtemperatur |
| TFA: | Trifluoressigsäure |
| TIPS: | Triisopropylsilan |
| TPTU: | O-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat |
| Trityl: | Triphenylmethyl |
| Wang-Harz: | 4-Hydroxybenzyloxybenzylalkohol-Harz |

9.3 Substanzen

Alle gängigen Ausgangssubstanzen wurden bezogen bei Fluka, Aldrich oder Nova Biochem, D-Aminosäuren wurden bei Bachem bezogen, der Photolinker bei Advanced Chemtech. PEGA-Harz wurde bezogen bei Polymer Laboratories, Rink-Amid-Harz und Wang-Hydroxy-Harz bei NovaBiochem.

Beladung PEGA-Harz: 0.2 mMol/g

Beladung Rink-Amid-Harz: 0.7 mMol/g

Beladung Wang-OH-Harz: 0.3 mMol/g

9.4 Puffer

Für die Arbeit mit dem anti-Lamifiban-mAB wurde PBS-Puffer (20 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl) mit pH 7.2 und 0.3 mM Natriumazid verwendet.

9.5 Geräte und Apparaturen

- Parallelsynthese: Parallelsyntheseeinheit für 24 Reaktionen, beheizbar, mit Steuereinheit, Eigenentwicklung der Werkstatt Roche.
- Split&Mix-Synthese: Coshisoft Peptisearch CSPS, Multiblock, Einheit zur Durchführung von 42 Reaktionen parallel à je 2ml Volumen.
- FPLC: Pharmacia FPLC System 500
- Äkta Purifier Series 900, Amersham Pharmacia Biotech
- UV-Lampe: Blak-Ray, Model B 100 AP (Sylvania R 100W Mercury Spot U.S.A. H44GS-100)
- Rotationsverdampfer: Büchi Rotavapor RE 111
- UV: Kontron Instruments, Uvikon 860
- SpeedVac: Savant Integrated SpeedVac System ISVS 110
- Fluoreszenzmikroskop:
 - Mikroskop: Stereomikroskop Leica MZ 12
 - Fluoreszenzlampe: Leica GFP Plus Fluorescence
 - CCD-Kamera: Leica 2
 - Kamerasoftware: Image Access Version 2.05 d, von Imagic Bildverarbeitung AG, Glattbrugg
 - Bildverarbeitungssoftware: Leica QWin Standard Version 2.1 von Leica Imaging Systems

9.6 Chromatographische Methoden

- Dünnschichtchromatographie (DC)

Alle DC wurden mit DC-Platten Kieselgel 60F₂₅₄ von Merck durchgeführt.

Als Anfärbereagens für die DC wurde eine 0.05 % wässrige KMnO₄-Lösung verwendet ¹⁵⁶.

- Präparative Dünnschichtchromatographie

PSC-Platten 20x20 cm, Kieselgel 60 F₂₅₄, 2mm von Merck

- Säulenchromatographie

Kieselgel 60 M, 0.04 – 0.063 mm/230 – 400 mesh ASTM für die Säulen-Chromatographie von Macherey-Nagel

- HPLC

Hewlett Packard Series 1050 mit Autosampler

Säule: YMC-Pack ProC18, AS-300

Messkanal bei 280 und 460 nm, Referenzkanal bei 550 nm

Als Flussmittel wurde H₂O für die Chromatographie und ACN für die Chromatographie mit jeweils 1% HCOOH eingesetzt.

Methode:

30 % auf 80 % ACN in 5 Min

80 % ACN für 1.5 Min

80 % auf 30 % ACN in 2 Min

30 % ACN für 2 Min

Fluss: 1.5 ml/ Min

- FPLC

Äkta Purifier Series 900 von Amersham Pharmacia Biotech

Säule: Merck Superformance 26

Material: Source 15 RPC

Methode: generell 10 % ACN auf 50 % ACN in 3 h

Fluss: 3 – 4 ml/Min

9.7 Spektroskopische Methoden

- UV/VIS

Kontron UVICON 810 Spektrophotometer: 195 - 900 nm

- IR

Nicolet 20 SX Fourier Transform IR Spektrometer

- ATR-IR

Nicolet Magna 550/860 Fourier Transform IR Spektrometer mit einem Spectratech Nicplan Fourier Transform IR Mikroskop mit ZnSe ATR-Objektiv. Die Auflösung beträgt 2 cm⁻¹, es werden jeweils 300 – 1000 Scans addiert. Es wird ein MCT-Detektor verwendet.

- ¹H-NMR/¹³C-NMR

Bruker Avance300 NMR Open Access

Bruker DPX 400 MHz für ¹H & ¹³C-NMR

Bruker DPX 400 MHz für ¹H-, ¹³C-, ¹⁹F- und ³¹P-NMR.

Bruker DRX 400 MHz mit HR MAS-unit und Durchfluss-Probenkopf. Alle NMR-aktiven Kerne messbar.

- MS

Sciex API 100LC Flow Injection MS Open Access

Finnigan MAT SSQ7000

Perkin Elmer SCIEX API 365 Triple-Quadrupol

Hewlett Packard 5989 "Engine"

- Elementaranalysen

9.8 Affinitätsmessungen

- IC₅₀ Messungen

Entsprechend dem Arbeitsprotokoll „Fibrinogen Binding to Immobilized GP IIb-IIIa (Solid-Phase Receptor ELISA)“, March 1995, zur Verfügung gestellt und durchgeführt von Dr. Beat Steiner, Hoffmann-La Roche.

- K_D-Werte

Messung mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Methode.

Biacore® 2000

Biacore® HS

- Leuchtwerte auf den PEGA-Beads

Zur Messung der relativen Leuchtintensität der Harzkügelchen („Beads“) wird ein Aliquot Harz (ca. 250 µl) in einem 2 ml Eppendorf-„Tube“ mit PBS-Puffer gewaschen. Danach werden davon ca. 100 Beads in eine 96er Mikrotiterplatte mit transparentem Boden überführt und 100 µl mAB-Lösung zugegeben. Die Mikrotiterplatte wird zugedeckt und während ca. 24 h leicht geschüttelt. Danach wird die mAB-Lösung abgezogen und gesammelt. Die Beads werden mit der Pipette kurz mit 100 µl PBS gespült, welches sogleich wieder abgezogen wird. Danach wird ein Teil der Beads auf einen PE-Petrischalendeckel (Greiner Labortechnik) gegeben und mit 200 µl Glycerin überdeckt. Der Boden der Petrischale wird dann umgekehrt auf die Probe gelegt, sodass sich ein gleichmässig dicker Glycerinfilm bildet. Die Proben sind somit bereit für die Messung mit dem Fluoreszenzmikroskop. Zur statistischen Auswertung der Leuchtstärken der Beads wurden von allen Beadsorten mittels einer CCD-Kamera Bilder gemacht. Davon wurden jeweils eine statistisch relevante Anzahl Beads mit einer Bildverarbeitungssoftware (QWin von Leica)) ausgewertet: In die Beads wurde ein passendes Quadrat gelegt, von welchem die horizontalen Durchschnitts-Leuchtwerte der Pixel berechnet wurden (**Figur 24**). Aus diesen Werten wurde in einer MS Excel-Tabelle der vertikale Durchschnittswert, also der Gesamtdurchschnitt für ein Bead berechnet. Aus diesen Gesamtdurchschnitten der einzelnen Beads wurde dann der Medianwert für mehrere Beads berechnet. Dieselbe Prozedur wurde für den Hintergrund des jeweiligen Bildes durchgeführt. Die Differenz aus dem Medianwert einer Beadsorte und dem Medianwert des Hintergrundes ergibt dann den relativen Leuchtwert einer Beadsorte. Da die Konzentrationen der verwendeten mAB-Lösungen

nicht bei jedem Ansatz gleich gross waren, können nur die Leuchtwerte der Beadsorten miteinander verglichen werden, die im gleichen Ansatz gemessen wurden.

9.9 Biochemische Methoden

- Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Elektrophoresenkammer XCell Surelock™
Netzgerät Modell BioRad 3000Xi
Fertiggele von BioRad

- Coomassie-Blau-Färbung

Die Gele wurden während 2 h in eine Coomassie-Blue Lösung in Wasser/Essigsäure/Ethanol (4:1:5) gelegt und leicht geschüttelt.

Zur Entfärbung wurde das Gel in eine Lösung von Wasser/Essigsäure/Ethanol (4:1:5) gegeben und leicht geschüttelt, bis das Gel vollständig entfärbt war.

9.10 Fluoreszenzmarkierung des LMF-1 mAB

Zur Fluoreszenzmarkierung des Antikörpers wurde ein Alexa Fluor™ 546 Protein Labeling Kit (A-10237) von Molecular Probes verwendet.

1. Eine 1 M Natriumbicarbonatlösung (pH 8.3) wird hergestellt.
2. Der Antikörper wird auf eine Konzentration von 2 mg/ml in PBS Puffer gebracht.
3. Zu 0.5 ml der 2 mg/ml Antikörperlösung werden 50 µl der 1 M Bicarbonatlösung zugegeben.
4. Ein Vial mit Alexa Fluor 546 Carbonsäure, Succinimidylester, Natriumsalz (MW 1079) wird auf RT gebracht und die in Schritt 3. vorbereitete Antikörperlösung wird dazugegeben. Die Reaktionslösung wird bei RT mit Magnetrührer während 1 h gerührt.
5. 17 ml einer Hydroxylaminlösung (20 µg in 100 µl H₂O) werden zum Reaktionsgemisch zugegeben und die Lösung wird 30 Min. weitergerührt.
6. Das Reaktionsgemisch wird mit PBS-Puffer über eine Sephadex G25M NAP Säule aufgereinigt. Die erste rote Bande wird aufgefangen und am SpeedVac im Volumen reduziert.
7. Die molare Konzentration des Proteins wird wie folgt berechnet:



wobei A_{280} die Absorption bei 280 nm, A_{558} die Absorption bei 558 nm und 203'000 den Extinktionskoeffizienten eines typischen IgG darstellen. 0.12 ist ein Korrekturfaktor wegen der Absorption des Farbstoffes bei 280 nm.

8. Die epitope Dichte der Fluoreszenzfarbstoffmoleküle auf dem mAB wird folgendermassen berechnet:



wobei 104'000 der ungefähre Extinktionskoeffizient des Alexa-Farbstoffes bei 558 nm ist.

Bei allen Kopplungen des Farbstoffes an den LMF-1 mAB wurden epitope Dichten von 2 – 2.5 erzielt.

9.11 SPPS Protokolle

- Waschprotokoll:

2x mit Isopropanol, je 2 Min.

2x mit NMP, je 2 Min.

2x mit Isopropanol je 2 Min.

3x mit NMP je 3 Min.

- HATU-Kopplungsprotokoll

Zu einem Aliquot Harz wird eine präaktivierte Lösung bestehend aus 5 Äquivalenten Fmoc-Aminosäure (0.5 M Lösung in NMP), 5 Äquivalenten HATU (0.5 M Lösung in NMP), 5 Äquivalenten HOAt (1 M Lösung in NMP) und 10 Äquivalenten DIPEA gegeben. Das Reaktionsgefäß wird auf das 1.5 fache des Harzvolumens mit NMP aufgefüllt und während 1.5 h bei RT geschüttelt, danach mit dem Waschprotokoll 1 gewaschen.

- TPTU-Kopplungsprotokoll

Zu einem Aliquot Harz wird eine präaktivierte Lösung bestehend aus 10 Äquivalenten Fmoc-geschützte Aminosäure (0.5 M Lösung in NMP), 10 Äquivalenten TPTU (0.5 M Lösung in NMP) und 20 Äquivalenten DIPEA gegeben. Das Reaktionsgefäß wird auf das 1.5 fache des Harzvolumens mit NMP aufgefüllt und während 1.5 h bei RT geschüttelt, danach mit dem Waschprotokoll 1 gewaschen.

- Protokoll für Doppelkopplung von Aminosäuren

Nacheinander werden das HATU-Kopplungsprotokoll und das TPTU-Kopplungsprotokoll angewendet.

- Kaiser-Test für 1° Amine

Es werden drei Lösungen bereitgestellt:

Lösung A: 100 mg Phenol in 25 ml Ethanol

Lösung B: 24.5 ml Pyridin, 0.5 ml 0.01 M KCN

Lösung C: 0.5 g Ninhydrin in 10 ml Ethanol

In einem Eppendorf-„Tube“ werden je 20 µl der drei Lösungen zu einem Aliquot Harz (ca. 100 Beads) gegeben und die Lösung wird 10 Minuten bei 90°C erhitzt. Verfärbt sich das Harz blau, hat es noch 1° Amine am Harz.

- Bereitstellung von PEGA-Harz zur Synthese: Fmoc-PEGA → **13 a**

Da das PEGA-Harz vom Lieferanten als Fmoc-geschütztes Harz geliefert wird, muss die Aminogruppe zuerst entschützt werden. Das Harz wird 20 Minuten mit 20 % Piperidinlösung (in NMP) bei RT behandelt und danach ausgiebig mit Isopropanol und CH₃OH gewaschen.

9.12 Kopplung von Substanzen aus dem Lamifiban-Projekt auf PEGA-Harz

Zur Kopplung der Substanzen wurden jeweils 25 mg (ca. 5 µMol) entschütztes PEGA-Harz **13 a** eingesetzt. Dazu wurden jeweils 5 mg der Substanzen (ca. 10 µMol, 2 Äquivalente), 4 mg (10

μMol) HATU und 2.5 μl (20 μMol) DIPEA gegeben und das RG auf das 1.5 fache des Harzvolumens mit NMP aufgefüllt. Das RG wurde während 2 h bei RT geschüttelt, danach alternierend mit Isopropanol und NMP gewaschen. Zum Schluss wurde das Harz mit PBS-Puffer gespült.

9.13 Synthese der zehn Tetrapeptide aus dem Screening der Split & Mix-Bibliotheken

Die Peptide **1 – 10** wurden nach dem HATU-Kopplungsprotokoll synthetisiert. 400 mg (0.1 mMol) Rink-Amid-Harz mit einer Beladung von 0.25 mMol/g Harz wurden zuerst 20 Min. mit 20 % Piperidinlösung in NMP behandelt und danach gründlich mit Isopropanol und NMP gewaschen. Die Peptide wurden mittels Doppelkopplungen der einzelnen Aminosäuren hergestellt. Jeweils 1 ml 0.5 M (0.5 mMol) Aminosäurelösung in NMP wurden mit 1 ml 0.5 M HATU/TPTU (0.5 mMol), 0.5 ml 1M HOAt (0.5 mMol) und 125 μl (1.0 mMol) DIPEA während 10 Minuten voraktiviert und danach zum Harz gegeben. Das Harz wurde während 1 h bei RT geschüttelt, danach wieder gründlich mit Isopropanol und NMP gewaschen. Um Fehlsequenzen zu vermeiden wurden die unreaktierten Amingruppen am Harz nach jeder Doppelkopplung mit einer Lösung aus NMP und Essigsäureanhydrid (4:1) während 1 h bei RT acetyliert. Nach jeder Acetylierung wurde das Harz 20 Min. mit 20 % Piperidinlösung in NMP behandelt und wiederum ausgiebig gewaschen. Nach der Kopplung der letzten Aminosäure wurde das Harz 1.5 h mit einer TFA/H₂O/TIPS-Lösung (95/3/2) bei RT behandelt. Die Spaltlösung wurde abgesaugt und das Harz noch einmal mit wenig TFA-Lösung nachgewaschen. Durch Zugabe von Diethylether/Hexan 1/5 wurde das Peptid ausgefällt, abfiltriert und am Vakuum getrocknet. Die Peptide wurden mittels präparativer HPLC gereinigt und das Lösungsmittel eingengt.

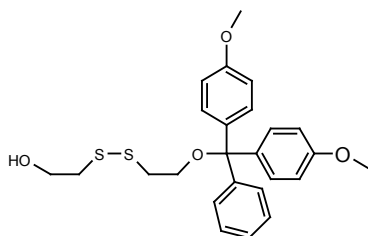
Die Sequenzen mit der Reihenfolge des Einsatzes der Aminosäuren und deren spektroskopische Daten sowie die Ausbeuten nach der Chromatographie sind in untenstehender Tabelle aufgeführt.

| Nr. | Sequenz | Reihenfolge der Kopplung | MS (M+H) ⁺ / ((M+2H)/2) ⁺ | Ausbeuten nach präp-HPLC |
|-----------|---------------------|-----------------------------|---|--------------------------|
| 1 | Phe-Arg-Arg-Arg-Gly | Gly – Arg – Arg – Arg – Phe | 690 | 36 % |
| 2 | Lys-Arg-Phe-Arg-Gly | Gly – Arg – Phe – Arg – Lys | 662, 331 | 34 % |
| 3 | Tyr-Met-Glu-Ala-Gly | Gly – Ala – Glu – Met – Tyr | 569 | 51 % |
| 4 | Arg-Tyr-Glu-His-Gly | Gly – His – Glu – Tyr – Arg | 660, 330 | 35 % |
| 5 | Tyr-Arg-Leu-Met-Gly | Gly – Met – Leu – Arg – Tyr | 638, 320 (654; M+16) | 40 % |
| 6 | Pro-Arg-Asn-Arg-Gly | Gly – Arg – Asn – Arg – Pro | 598 | 50 % |
| 7 | His-Glu-Phe-Phe-Gly | Gly – Phe – Phe – Glu – His | 636 | 36 % |
| 8 | His-Glu-Ile-Phe-Gly | Gly – Phe – Ile – Glu – His | 602 | 43 % |
| 9 | His-Ile-Phe-Phe-Gly | Gly – Phe – Phe – Ile – His | 620 | 48 % |
| 10 | His-Ile-Ile-Phe-Gly | Gly – Phe – Ile – Ile – His | 586 | 47 % |

9.14 Synthese des Disulfidlinkers in Lösung

Synthese von 2-Dithioethanol-2'-Dimethoxytritylether (11)

Zu 9.5 ml (78 mMol) 2,2'-Dithiodiethanol in 5 ml Pyridin abs. werden unter Rühren bei Raumtemperatur innert 2 h 20.5 g (60 mMol) DMT-Cl in 100 ml Pyridin abs. zugetropft und während weiteren 16 h unter N₂ gerührt. Die Reaktion wird mit 20 ml Methanol während 30 min gequenchet. Das RG wird auf 50 ml H₂O gegossen und 3x mit 30 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und abfiltriert. Nach dem azeotropen Einengen mit Toluol erhielt man ein gelbes Öl. Dieses wird über eine SiO₂-Säule mit Hexan/tert. Butylmethylether 1:1 (2 % TEA) gereinigt. Es werden 15g (33 mMol, 55 %) gelbes Öl isoliert.



11

IR: 3432 (-OH), 1608 (Aromat), 1445 (C-Ar), 1070 (Aryl-Ether)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO): 2.68 (t, 2H, S-CH₂-CH₂-OH, J(2,1) = 6.48 Hz); 3.53-3.58 (m, 2H, S-CH₂-CH₂-OH, J(1,2) = 6.2 Hz, J(2,OH) = 5.8 Hz); 2.91 (t, 3H, S-CH₂-CH₂-O-DMT, J(1',2') = 6.01 Hz); 3.21 (t, 2H, S-CH₂-CH₂-O-DMT, J(2',1') = 6.09 Hz); 3.73 (s, 6H, O-CH₃); 4.84 (t, 1H, CH₂-OH, J(OH,2) = 5.4 Hz); 6.8-7.4 (m, 13H, Aromaten)

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO): 41.4 (2'), 46.12 (2), 55.4 (4), 59.84 (1'), 62.07 (1), 86.04 (3), 113.56 (3''), 127-128.2 (2''', 3''', 4'''), 130.03(2''), 136.04 (1'''), 145.25 (1''), 158.49 (4'')

EI-MS: 456 (M); 379 (M-C₆H₅); 303 (DMT⁺)

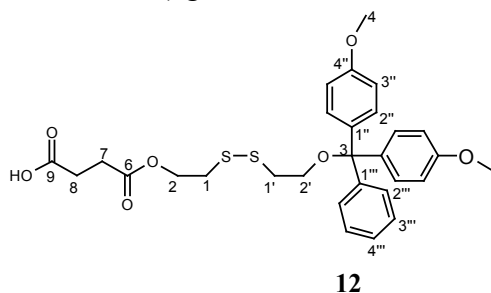
ISP-MS: 515 (M⁺+Ni)⁺; 303 (DMT⁺)

MA: Ber. C: 65.76 %, H: 6.18 %, S: 14.04 %; Gef. C: 64.53 %, H: 6.45 %, S: 13.17 %

Synthese von Dithioethanol-2'-Dimethoxytritylether-2-Succinat (12)

15 g (33 mMol) 2-Dithioethanol-2'-Dimethoxytritylether wird mit 10.1 g (90 mMol) Bernsteinsäureanhydrid und 12 g DMAP (99 mMol) in 120 ml Pyridin abs. und 120 ml Dichlormethan gelöst und 24 h unter N₂ gerührt. Das braune RG wird auf 500 ml 1 % Essigsäure gegossen und 4x mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, abgenutscht und einrotiert. Das restliche Pyridin wird 3x mit Toluol azeotrop abdestilliert. Das braune Öl wird auf einer SiO₂-Säule (Ø 5 cm,

Länge 15 cm) mit Methanol/EE 1:9 (2 % TEA) als Laufmittel gereinigt. Man erhält 12.1 g (222 mMol, 66 %) gelbes Öl.



IR (cm⁻¹): 2496 (-COOH), 1737 (Ester-C=O), 1608 (Aromat), 1445 (C-Ar), 1251, 1157 (Ester, COOH), 1170, 1034 (Aryl-Ether), 832 (p-disubst. Benzol)

¹H-NMR: 2.6 (m, 4H, O=C-CH₂-CH₂-C=O), 2.79 (t, 2H, C1, J(1,2) = 6.4 Hz); 2.86 (t, 2H, C1', J(1',2') = 6.4 Hz); 3.36 (t, 2H, C2, J(2,1) = 6.4 Hz); 3.79 (s, 6H, C4); 4.28 (t, 2H, C2', J(2',1') = 6.6 Hz); 6.9, 7.2-7.4 (m, 13H, Aromaten)

¹³C-NMR:

ISN-MS: 555 (M-H)⁻

MA: Ber. C: 62.57 %, H: 5.79 %, S: 11.52 %; Gef. C: 61,45 %, H: 6.14 %, S: 9.29 %

Sarcosin-modifizierung von PEGA-Harz (13 b)

Ein Aliquot unsubstituiertes PEGA-Harz (**13 a**) wird mit 5 Moläquivalenten Fmoc-Sarcosin, 5 Moläquivalenten HATU und 10 Moläquivalenten DIPEA versetzt und mit NMP auf das anderthalbfache Harzvolumen ergänzt. Das RG wird 2 h bei RT geschüttelt und danach ausgiebig mit Isopropanol und NMP gewaschen.

Durch Behandlung mit 20 % Piperidinlösung während 20 Minuten wird die Fmoc-Gruppe abgespalten.

UV/VIS_{ε298}: berechnete Beladungen: 0.12 – 0.18 mMol/g; 240 – 360 pMol/Bead

Kopplung von Dithioethan-2'-Dimethoxytritylether-2-Succinat (12) an PEGA-Harz (14)

Zu 700mg mit NMP gespültem PEGA-Harz (≅ 0.14 mMol, 4.8 g in Methanol gequollen) (**13 a**) wird eine voraktivierte Linkerlösung bestehend aus 950 µl 0.5 M (0.42 mMol) HATU, 430 µl 1 M (0.42 mMol) HOAt, 470 µl (0.85 mMol) DIPEA und 230 mg (0.42 mMol) 2-Dithioethan-2'-Dimethoxytritylether gegeben. Das Reaktionsgefäß wird mit NMP auf das 1.5 fache des Harzvolumens ergänzt. Das RG wird während 16 h geschüttelt. Danach wird das Harz nach Protokoll 1 gewaschen.

Die Beladung liegt zwischen 0.1 mMol/g Harz und 0.17 mMol/g Harz.

MA: C: 62.26 %, H: 6.27 %, S: 11.08 %

MA PEGA roh: C: 48.9 %, H: 7.9 %, S: 0 %
IR (cm⁻¹): 1720 (Ester-CO), 1547 (Aromat)

Abspaltung der DMT-Schutzgruppe (15)

Das mit dem Disulfidlinker modifizierte Harz wird mit einer Lösung aus 95 % TFA, 3 % H₂O und 2 % TIPS versetzt und während 1 h geschüttelt.

Danach wird das Harz ausgiebig mit Isopropanol und NMP gewaschen.

MA: C: 58.16 %, H: 6.3 %, N: 2.95 %, S: 13.5 %
IR (cm⁻¹): 1201 (CH₂OH)

Kopplung der 1. Aminosäure an das modifizierte Harz (16)

Zu 650 mg mit NMP gespültem PEGA-Harz (0.13 mMol) werden 430 µl (0.19 mMol) 0.5 M Aminosäurelösung, 39 mg (0.19 mMol) DCC, 250 µg (1.9 µMol) DMAP und 15 µl (0.19 mMol) Pyridin abs. gegeben und das Reaktionsgefäß mit Dichlormethan/NMP 5:1 auf das 1.5 fache des Harzvolumens ergänzt. Das RG wird während 3 h geschüttelt, danach gewaschen und die Kopplung in gleicher Weise noch einmal wiederholt.

Die Kopplung der ersten Aminosäure verläuft nach Fmoc-Messung ($\epsilon_{300} = 7840$) quantitativ.

MA: C: 50.56 %, H: 8.72 %, N: 4.40 %, S: 0.54 %

Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe (17)

Das Harz (16) wird mit Piperidinlösung (20 % in NMP) versetzt und 20 Minuten bei RT geschüttelt. Danach wird das Harz intensiv mit Isopropanol und NMP gewaschen.

UV/VIS _{$\epsilon_{466} = 33 \cdot 1000$} : berechnete Beladung: 0.11 mMol/g; 220 pMol/Bead

Synthese und Abspaltung des Peptids Met-Arg-Phe-Arg-Gly (18, 19)

An 600 mg mit NMP gespültem modifiziertes Harz (17) (0.13 mMol), werden nach dem „HATU-Kopplungsprotokoll“ nacheinander die Aminosäuren Fmoc-Arg(Pmc), Fmoc-Phe, Fmoc-Arg(Pmc)

und Fmoc-Methionin gekoppelt und entschützt. Es werden jeweils 1.3 ml 0.5 M Aminosäurelösungen (0.65 mMol), 1.3 ml 0.5 M HATU (0.65 mMol), 0.65 ml 1 M HOAt (0.65 mMol) und 170 μ l (1.3 mMol) DIPEA zur Kopplung der Aminosäuren eingesetzt, wobei diese 10 Minuten voraktiviert werden.

UV/VIS_{ε466 = 33·000}: berechnete Beladung: 0.12 mMol/g; 240 pMol/Bead
Edman-Abbau: 200 pMol/Bead

Bei Abspaltung mit 5 % Mercaptoethanol in ACN/H₂O erhält man:

ISP-MS 1498 (M_{ox}+H)⁺, 749 (M_{ox}+2H)²⁺ (**18**)

MALDI-TOF-MS pos: 1497 (M_{ox}+H)⁺, 1231 (M_{ox}-Pmc+H)⁺ (**18**)

Bei Abspaltung mit 5 % Mercaptoethanol in ACN/H₂O bei pH 9 erhält man:

ISP-MS (M+H)⁺: 1421 (**19**)

Synthese von PEGA-Linker-Gly-(Boc)Lys(Dabsyl)-OH am Harz (**20**)

0.2 g (0.04 mMol) mit Disulfidlinker und Glycin modifiziertes Harz (**17 a**) werden mit einer präaktivierten Lösung von 110 mg (0.2 mMol) Boc-Lys(Dabsyl)-OH, 80 mg (0.2 mMol) HATU und 50 μ l DIPEA versetzt und während 2 h geschüttelt. Danach wird das Harz ausgiebig gewaschen.

Ein Aliquot des Harzes (ca. 100 Beads) wurden während 10 Min. mit 50 μ l 25 % NH₄OH-Lösung behandelt und die Abspalllösung im UV und MS untersucht:

UV/VIS_{ε466 = 33·000}: berechnete Beladung: 105 pMol/Bead
ISP-MS: 650 (M+H)⁺ (**20 b**)

Ein Aliquot des Harzes (ca. 100 Beads) wurde während 2 - 5 Min. mit 50 μ l 1 % bzw. 5 % Mercaptoethanol in ACN oder 50 mM DTE in H₂O/ACN (alle mit NH₃ auf pH 9 gebracht) behandelt und die Abspalllösung im UV und MS untersucht

UV/VIS_{ε466 = 33·000}: berechnete Beladung: 105 pMol/Bead
ISP-MS: 651 (M+H)⁺ (**20 a**)

Synthese der Peptidsequenz Gln-Arg-Pro-Tyr-Gly (**21 a – 25 a**) auf mit Disulfidlinker modifiziertem Harz **15**

Die Peptidkopplungen werden nach dem HATU-Kopplungsprotokoll durchgeführt. Nacheinander wurden die Aminosäuren Fmoc-Glycin (\rightarrow **21**), Fmoc-Tyrosin(tBu) (\rightarrow **22**), Fmoc-Prolin (\rightarrow **23**), Fmoc-Arginin(Pmc) (\rightarrow **24**) und Fmoc-Glutamin(trt) (\rightarrow **25**) eingesetzt.

Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen wurde das Harz nach jedem Schritt je 5 Min. mit 20 % Piperidinlösung behandelt. Zur Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen wurde das Harz während einer Stunde bei RT mit einer Lösung aus 95 % TFA, 3 % H₂O und 2 % TIPS behandelt.

Mit Harz **15 a**:

Edman-Sequenzierung: stetige Abnahme der Beladung des Harzes von ca. 180 pMol/Bead bei **21** auf 20 pMol/Bead bei **25**.

Mit Harz **15 b**:

ISP-MS: Single-Bead: 620 (M+H)⁺

Edman-Sequenzierung: Beladung 300 pMol/Bead von **21** – **25** über die ganze Sequenz

Mit Harz **15_{de}**:

Edman-Sequenzierung: Beladung 500 pMol/Bead von **21** – **25** über die ganze Sequenz

ISP-MS: Single-Bead: 620 (M+H)⁺

9.15 Synthese eines Disulfidlinkers direkt auf Festphase

Kopplung von 2-Dithioethanol-2'-Dimethoxytritylether (12) an modifiziertes (13 b) und unmodifiziertes (13 a) PEGA-Harz – Mitsunobu-Kopplung → 28 a und 28 b

200 mg (0.04 mMol) PEGA-Harz (**13**) (trocken) werden mit Dichlormethan gewaschen. Danach wurden 46 mg (0.08 mMol) **2**, 21 mg (0.08 mMol) Triphenylphosphin zugegeben und gelöst. Unter Stickstoff werden dann 7 mg (0.04 mMol) DEAC zugegeben und das Reaktionsgemisch 24 h bei RT geschüttelt. Das Harz (**28 a und 28 b**) wird gewaschen und per Mikroanalyse die Beladung kontrolliert.

MA: bei beiden Harzen kein S nachweisbar

Kopplung von Succinanhydrid an Sarcosin-modifiziertes Harz 13 b → 33

Zu 400 mg (0.056 mMol) mit Sarcosin modifiziertem Harz **13 b** werden 570 mg (5.6 mMol) Succinanhydrid und eine kat. Menge DMAP zugegeben. Das Gemisch wird in 5 ml Pyridin/CH₂Cl₂ 1:1 während 2 Tagen bei RT geschüttelt.

Ein Kaiser-Test negativ und zeigt keine 1° Amine.

Kopplung von Dithiodiethanol an (33) zum „fertigen“ Linker (34)

Zu 400 mg (0.056 mMol) säuremodifiziertem Harz (33) werden 1.7 ml (11.2 mMol) 2,2'-Dithiodiethanol, 1.2 g (5.6 mMol) DCC und eine kat. Menge DMAP in 10 ml Pyridin/CH₂Cl₂ 1:1 gegeben und während 16 h bei RT geschüttelt.

MA: C: 48.90 %, H: 8.47 %, N: 4.11 %, S: 0.52 %, berechnete Beladung: 0.044 mMol/g (90 pMol/Bead)

Synthese von Cystein-substituiertem PEGA-Harz und Acetylierung zu 29 b

Zu 500 mg (ca. 0.1 mMol) PEGA-Harz wurde eine 10 Minuten voraktivierte Lösung aus 580 mg (1 mMol) Fmoc-Cys(Trt) in 2 ml 0.5 M TPTU-Lösung (1 mMol) und 260 µl DIPEA (2 mMol) gegeben und während 2 h bei RT geschüttelt. Das Harz wurde gut mit Isopropanol und NMP gewaschen und 5 Min. mit 20 % Piperidinlösung behandelt. Nach nochmaligem Waschen des Harzes wird das Harz 20 Min. bei RT mit 25 % Essigsäureanhydrid behandelt und wiederum gewaschen.

Beladungsbest. durch Fmoc-Abspaltung: 1.5 mMol/g

MA: C: 54.27 %, H: 8.43 %, N: 4.59 %, S: 0.38 %, berechnete Beladung: 0.18 mMol/g

Die Tritylgruppe wird durch die Behandlung des Harzes mit einer Lösung aus TFA/H₂O/TIPS 95/3/2 während einer Stunde bei RT gespalten.

MA: C: 51.18 %, H: 8.62 %, N: 4.65 %, S: 0.40 %

Synthese von Cysteinanalog- substituiertem PEGA-Harz und Acetylierung zu 29 a

Zu 3 g (ca. 0.6 mMol) PEGA-Harz wurde eine 10 Minuten voraktivierte Lösung aus 760 mg (2.0 mMol) HATU, 280 mg (2.0 mMol) HOAt, 0.5 ml (4.0 mMol) DIPEA und 700 mg (2.0 mMol) S-Trityl-3-Mercaptopropionsäure in 40 ml NMP gegeben und während 90 Min. bei RT geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde ausgiebig mit Isopropanol und NMP gewaschen.

IR (cm⁻¹): 701, 734 (monosubst. Benzol)

MA: C: 53.07 %, H: 8.38 %, N: 4.54 %, S: 0.46 %, berechnete Beladung 0.16 mMol/g; 320 pMol/Bead

Die Tritylgruppe wird durch die Behandlung des Harzes mit einer Lösung aus TFA/H₂O/TIPS 95/3/2 während einer Stunde bei RT gespalten.

IR (cm⁻¹): 701, 734 verschwinden, 718

Bildung der Disulfidbrücke auf Festphase durch Oxidation von 29 b → 31 b

Jodmethode:

100 mg (0.02 mMol) Harz **29 b** werden mit 0.3 ml (4 mMol) Mercaptoethanol versetzt. Dazu werden unter Schütteln langsam 5 ml 0.5 N Jodlösung (2.5 mMol) in H₂O/CH₃OH zugetropft. Die Lösung wird sofort nach Zutropfen farblos. Nach Zugabe wird das RG noch 1 h bei RT geschüttelt und danach gut gewaschen.

MA: keine Veränderung festgestellt.

AgNO₃-Methode:

100 mg (0.02 mMol) Harz **29 b** werden mit 0.3 ml (4 mMol) Mercaptoethanol versetzt. Dazu werden unter Schütteln langsam 5 ml 0.5 M AgNO₃-Lösung (2.5 mMol) in H₂O zugetropft. Die Lösung wird milchig weiss und die Beads werden weiss. Nach Zugabe wird das RG noch 14 h bei RT geschüttelt und danach gut gewaschen. Der weisse Niederschlag wird nach 10 x Waschen mit 30 % CH₃COOH grösstenteils herausgewaschen.

MA: C: 49.61 %, H: 8.5 %, N: 4.45 %, S: 1.14 %, berechnete Beladung: 0.15 mMol; 300 pMol/Bead, (83 %)

NaTeO₃-Methode:

100 mg (0.02 mMol) Harz **29 b** werden mit 0.3 ml (4 mMol) Mercaptoethanol versetzt. Dazu werden unter Schütteln langsam 5 ml 0.5 M NaTeO₃-Lösung (2.5 mMol) in H₂O zugetropft. Die Lösung wird sofort nach Zutropfen schwarz und die Beads werden schwarz. Nach Zugabe wird das RG noch 1 h bei RT geschüttelt und danach gut gewaschen. Der schwarze Niederschlag kann nicht von den Beads entfernt werden, die flexible Struktur der Beads ist zerstört.

Bildung der Disulfidbrücke auf Festphase durch Oxidation von 29 a → 31 a

K₂S₄O₆-Methode:

100 mg (0.02 mMol) Harz **29 a** werden mit 212 mg (0.7 mMol) K₂S₄O₆ versetzt und bei RT während 3 h geschüttelt. Danach wird das RG mehrmals mit H₂O gewaschen. Zum Harz werden 0.3 ml (4 mMol) Mercaptoethanol gegeben, mit H₂O auf das anderthalbfache des Harzvolumens aufgefüllt und während 14 h bei RT geschüttelt. Danach wird das Harz gründlich mit Isopropanol und Ethanol gewaschen.

MA: C: 52.08 %, H: 8.5 %, N: 4.8 %, S: 0.6 %, berechnete Beladung: ca. 0.04 mMol/g (80 pMol/Bead)

Luftoxidation:

100 mg (0.02 mMol) Harz **29 a** werden mit 0.3 ml (4 mMol) Mercaptoethanol versetzt und mit H₂O auf das anderthalbfache des Harzvolumens aufgefüllt. Das RG wird während 14 h bei RT geschüttelt. Danach wird das Harz gründlich mit Isopropanol und Ethanol gewaschen.

MA: C: 51.62 %, H: 8.68 %, N: 4.82 %, S: 0.3 %, berechnete Beladung: ca. 0.03 mMol/g (60 pMol/Bead)

AgNO₃-Methode:

100 mg (0.02 mMol) Harz **29 b** werden mit 0.3 ml (4 mMol) Mercaptoethanol versetzt. Dazu werden unter Schütteln langsam 5 ml 0.5 M AgNO₃-Lösung (2.5 mMol) in H₂O zugetropft. Die Lösung wird milchig weiss und die Beads werden weiss. Nach Zugabe wird das RG noch 14 h bei RT geschüttelt und danach gut gewaschen. Der weisse Niederschlag wird nach 15maligem Waschen mit 30 % CH₃COOH grösstenteils herausgewaschen.

MA: C: 50.49 %, H: 8.37 %, N: 4.5 %, S: 1.04 %, Rs: 1.84 %, berechnete Beladung: ca. 0.13 mMol/g; 260 pMol/Bead

Bildung der Disulfidbrücke auf Festphase unter Bildung des 2,4-Dinitrobenzylidisulfid-Intermediats 29 a → 30 → 31 a

500 mg (0.1 mMol) Harz 29 a wurden mit 240 mg (1 mMol) 2,4-Dinitrobenzolsulfonylchlorid in 10 ml CH₂Cl₂ versetzt und während 14 h bei RT geschüttelt. Danach wurde das Harz intensiv mit Isopropanol und CH₃OH gewaschen.

IR (cm⁻¹): 846 (2 benachbarte arom. H); 735 (subst. Benzol)

Dann wurde das Harz mit 780 ml (10 mMol) Mercaptoethanol in 10 ml CH₃OH versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt und danach wiederum ausgiebig gewaschen mit Isopropanol und CH₂Cl₂. Anschliessend wurde nach dem Standard-Fmoc-Protokoll die Peptidsequenz Gly-Arg-Phe-Tyr synthetisiert, die danach mittels Edman-Sequenzierung analysiert wurde.

Edman: 200 - 230 pMol/Bead über alle Aminosäuren
ISP-MS: 541 (M+H)⁺

9.16 Dendrimerisierung von PEGA-Harz (35 – 37)

Erster Zyklus zum Dendrimer 35

Zu 1.0 g PEGA-Harz (**13 a**) in 10 ml DMF/CH₂Cl₂ werden 1.7 g (20 mMol) Acrylsäuremethylester und kat. Mengen an FeCl₃ gegeben. Das RG wird bei 40°C während 5 h geschüttelt. Danach wird das Harz ausgiebig mit DMF und CH₂Cl₂ gewaschen. Ein Kaiser-Test war negativ.

IR (cm⁻¹): 1735 (Ester)

Das Harz wird mit 1.5 g (20 mMol) 1,3-Diaminopropan in 10 ml Methanol und einer kat. Menge an RhCl₃ versetzt und unter N₂ während 14 h bei RT geschüttelt. Danach wird das Harz **35** mit CH₂Cl₂ und Methanol gewaschen. Ein Kaiser-Test war stark positiv.

IR (cm⁻¹): 1735 verschwindet

Zweiter Zyklus zum Dendrimer 36

Zu 1.0 g Harz 35 in 10 ml DMF/CH₂Cl₂ werden 3.4 g (40 mMol) Acrylsäuremethylester und kat. Mengen an FeCl₃ gegeben. Das RG wird bei 40°C während 5 h geschüttelt. Danach wird das Harz ausgiebig mit DMF und CH₂Cl₂ gewaschen. Ein Kaiser-Test war negativ.

IR (cm⁻¹): 1735 (Ester)

Das Harz wird mit 3.0 g (40 mMol) 1,3-Diaminopropan in 10 ml Methanol und einer kat. Menge an RhCl₃ versetzt und unter N₂ während 14 h bei RT geschüttelt. Danach wird das Harz **36** mit CH₂Cl₂ und Methanol gewaschen. Ein Kaiser-Test war stark positiv.

IR (cm⁻¹): 1735 verschwindet

Dritter Zyklus zum Dendrimer 37

Zu 1.0 g Harz 35 in 10 ml DMF/CH₂Cl₂ werden 6.8 g (80 mMol) Acrylsäuremethylester und kat. Mengen an FeCl₃ gegeben. Das RG wird bei 40°C während 5 h geschüttelt. Danach wird das Harz ausgiebig mit DMF und CH₂Cl₂ gewaschen. Ein Kaiser-Test war negativ.

IR (cm⁻¹): 1735 (Ester)

Das Harz wird mit 6.0 g (80 mMol) 1,3-Diaminopropan in 10 ml Methanol und einer kat. Menge an RhCl₃ versetzt und unter N₂ während 14 h bei RT geschüttelt. Danach wird das Harz **37** mit CH₂Cl₂ und Methanol gewaschen. Ein Kaiser-Test war stark positiv.

IR (cm⁻¹): 1735 verschwindet
Beladung: 500 pMol/Bead (ca. 35 % Zunahme pro Stufe)

Sarcosin-Derivatisierung von Dendrimer-Harz 37 zu 13_{de}

Analog **13 b**, es werden aber 20 Moläquivalente an Fmoc-Sarcosin und HATU, sowie 40 Moläquivalente an DIPEA eingesetzt.

Kopplung des Disulfidlinkers auf Dendrimer-Harz, 15_{de}

Eingesetzt wird Harz **13_{de}**. Die Prozedur ist analog **14** für die Kopplung und **15** für die Entschützung.

Synthese von Tetrapeptid Gln-Arg-Pro-Tyr-Gly (25 a) auf Dendrimer-Harz mit Disulfidlinker 15_{de}

Protokoll analog **21 a – 25 a**. Zur MS-Analyse wurde ein Aliquot Harz (ca. 100 Beads) mit 10 µl 5 % Mercaptoethanol-Lösung in ACN/H₂O bei pH 9 während 10 Minuten geschüttelt.

MALDI-TOF-MS: 619 (M+H)⁺, 635 (M_{Säure, ox}+H)⁺
Edman-Sequenzierung: Beladung 500 pMol/Bead von **21 – 25** über die ganze Sequenz.

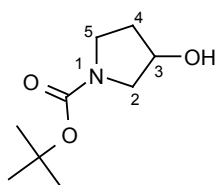
Synthese der Penta- bis Heptapeptide 40 – 48.

Protokoll analog HATU-Kopplungsprotokoll. Es wurden jeweils 100 mg (ca. 15 µMol) des Sarcosinmodifizierten PEGA-Harzes **15 b** eingesetzt. Am Schluss der Synthesen wurde das Harz jeweils 1 h mit einer TFA/H₂O/TIPS-Lösung (95/3/2) bei RT behandelt. Zur Abspaltung und „Single-Bead“-Analyse wurden die Beads nach der Anleitung in Kapitel 6.4.1 behandelt und gemessen, sowie teilweise mittels Edman-Abbau analysiert. Die Sequenzen mit der Reihenfolge des Einsatzes der Aminosäuren und deren spektroskopische Daten sind in untenstehender Tabelle aufgeführt.

| Nr. | Sequenz | Reihenfolge der Kopplung | MS (M+H) ⁺ ; Fragmente | ISP-MS (M+H) ⁺ | Edman-Sequenzierung |
|---|-----------------------------|-----------------------------|--|------------------------------|---------------------|
| 40 | Phe-Pro-Met-Lys-Thr | Thr-Lys-Met-Pro-Phe | 623, 639; 245, 376, 504, 120, 248, 379, 476 | 622, 623, 638 | |
| 41 | Cys-Arg-Asn-Asp-Cys | Cys-Asp-Asn-Arg-Cys | a) | 607 | |
| 42 | Trp-Tyr-Ser-His-Glu | Glu-His-Ser-Tyr-Trp | 721; 285, 372, 535 | 720 | |
| 43 | Met-Phe-Gln-Gly-Ile | Ile-Gly-Gln-Phe-Met | 595; 132, 279, 464/480, 143, 189, 317, 464 | 595 | |
| 44 | Phe-Leu-Ser-Val-Arg | Arg-Val-Ser-Leu-Phe | 621; 261, 175, 274, 361, 474 | 621 | 80 pMol/Bead |
| 45 | Gly-Ala-Arg-Cys-Phe | Phe-Cys-Arg-Ala-Gly | a) | | |
| 46 | Cys-Gly-Ala-Arg-Cys-Phe | Phe-Cys-Arg-Ala-Gly-Cys | a) | | |
| 47 | Ile-Gly-Glu-Pro-His | His-Pro-Glu-Gly-Ile | 552; 114, 186, 299, 397, 156, 253, 380, 439, 535 | 552 | 100 pMol/Bead |
| 48 | Ala-Asn-Ile-Gly-Glu-Pro-His | His-Pro-Glu-Gly-Ile-Asn-Ala | 737; 186, 299, 439, 552, 721 | 737 | 100 pMol/Bead |
| a) Cysteinhaltige Peptide auf Festphase konnten nicht analysiert werden | | | | | |

9.17 Bereitstellung der Boc-geschützten Aminoalkohole (Tabelle 17)

N-Boc-3-Pyrrolidinol (115): Zu einer Lösung von 5.3 g (24 mMol) Di-tert-Butyl-Dicarboxylat in 10 ml CH₂Cl₂ und 4.1 g (6 ml, 40 mMol) Triethylamin werden portionenweise 1.75 g (20 mMol) 3-Pyrrolidinol zugegeben und in einem Kolben mit CaCl-Rohr 24 h gerührt. Die Reaktion wird mit 5 ml Methanol gequenchet und 1 h weitergerührt. Das RG wird einrotiert und über SiO₂ (Ø 5cm, Länge 15cm, Laufmittel EE/Hexan 3:2 mit 2% TEA) gereinigt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und eingengt. Es werden 2.9 g (16 mMol, 75 %) hellgelbes zähflüssiges Öl isoliert.



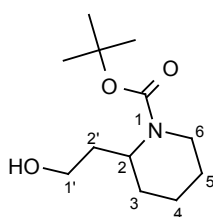
115

IR (cm⁻¹): 3426 (-OH), 2890, 2977 (aliph. CH), 1675 (Carbamat-CO), 1168 (Ester), 1065 (Alkohol-II-Bande)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.47 (s, -CH₃); 1.93-2.0 (m, -N-CH₂-CH₂-); 3.41-3.49 (m, -N-CH₂-); 4.46 (s, HO-CH₂-)

^{13}C -NMR: (100 MHz, CDCl_3): 28.9 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 34.05, 34.47 (4); 43.86, 44.28 (5); 54.57, 54.73 (2); 70.71, 71.54 (3); 79.73 ($\text{O}-\text{C}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 155.15 ($-\text{CO}$)
 ISP-MS: neg: 246 ($\text{M} + \text{OAc}$) $^-$

N-Boc-2-Piperidylethanol (116): Zu einer Lösung von 5.3 g (24 mMol) Di-tert-Butyl-Dicarboxylat in 10 ml CH_2Cl_2 und 4.1 g (6 ml, 40 mMol) Triethylamin werden portionenweise 2.3 g (20 mMol) 2-Piperidylethanol zugegeben und in einem Kolben mit CaCl -Rohr 24 h gerührt. Die Reaktion wird mit 5 ml Methanol gequencht und 1 h weitergerührt. Das RG wird einrotiert und über SiO_2 (\varnothing 5cm, Länge 15cm, Laufmittel EE/Hexan 3:2 mit 2% TEA) gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und eingengt. Es werden 2.9 g (12.6 mMol, 65 %) hellgelbes zähflüssiges Öl isoliert.



116

IR (cm^{-1}): ^1H -NMR (250 MHz, DMSO): 3453 ($-\text{OH}$), 2935, 2865 (aliph. CH), 1689 (Carbamat-CO), 1165 (Ester), 1053 (Alkohohl-II-Bande)

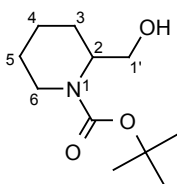
^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3): 1.48 ($-\text{CH}_3$); 1.40-1.63 (m, $-\text{N}-\text{CHR}-\underline{\text{CH}}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_{\text{ax}}\underline{\text{H}}_{\text{equ}}$, $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_{\text{a}}\underline{\text{H}}_{\text{b}}$); 1.17 (m, $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_{\text{ax}}\underline{\text{H}}_{\text{equ}}$); 1.94 (t, $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_{\text{a}}\underline{\text{H}}_{\text{b}}$, $J = 8.0$ Hz); 2.69 (t,d, $-\text{N}-\text{CH}_{\text{ax}}\underline{\text{H}}_{\text{equ}}$, $J_{6\text{ax}, 5} = 13.2$ Hz, $J_{6\text{ax}, 6\text{equ}} = 2.8$ Hz); 3.46 (s, br, $\text{HO}-\text{CH}_{\text{a}}\underline{\text{H}}_{\text{b}}$); 3.61(m, $\text{HO}-\text{CH}_{\text{a}}\underline{\text{H}}_{\text{b}}$); 3.85 (s, br, $-\text{OH}$); 3.96 (d, br, $-\text{N}-\text{CH}_{\text{ax}}\underline{\text{H}}_{\text{equ}}$, $J = 8.0$ Hz); 4.44 (s, br, $-\text{N}-\text{CH}-\text{R}_2$)

^{13}C -NMR: (100 MHz, CDCl_3):

EI-MS:

ISP-MS: neg: 288 ($\text{M} + \text{OAc}$) $^-$

N-Boc-2-Piperidylmethanol (117): Zu einer Lösung von 5.3 g (24 mMol) Di-tert-Butyl-Dicarboxylat in 10 ml CH_2Cl_2 und 4.1 g (6 ml, 40 mMol) Triethylamin werden portionenweise 2.4 g (20 mMol) 2-Piperidylmethanol zugegeben und in einem Kolben mit CaCl -Rohr 24 h gerührt. Die Reaktion wird mit 5 ml Methanol gequencht und 1 h weitergerührt. Das RG wird einrotiert und über SiO_2 (\varnothing 5cm, Länge 15cm, Laufmittel EE/Hexan 3:2 mit 2% TEA) gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und eingengt. Es werden 2.7 g (12.5 mMol, 62 %) hellgelbes zähflüssiges Öl isoliert.



117

IR (cm⁻¹): 3433 (-OH), 2853, 2925 (aliph. CH), 1653 (Carbamat-CO), 1169 (Ester)

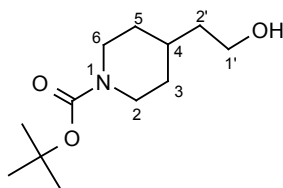
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.4-1.7 (m, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH-); 1.5 (-CH₃); 1.93, 1.6 (m, OH-CH₂-CH₂-); 2.69 (d, t, -N-CH_{ax}H_{equ}-, J_{5ax,6} = 13.2 Hz, J_{5ax,5equ} = 2.4 Hz); 3.35, 3.61 (s, br, HO-CH₂-); 3.96 (d, br, -N-CH_{ax}H_{equ}-, J = 10 Hz); 4.44 (s, N-CH-)

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO): 14.18 (4); 25.5 (3); 28.49 (-CH₃); 29.21 (5); 32.29 (2'); 39.43 (6); 45.84 (2); 58.52 (1'); 80.20 (O-C-(CH₃)₃); 156.5 (-CO)

EI-MS:

ISP-MS: neg: 274 (M + OAc)⁻

N-Boc-4-Piperidylethanol (118): Zu einer Lösung von 5.3 g (24 mMol) Di-tert-Butyl-Dicarboxylat in 10 ml CH₂Cl₂ und 4.1 g (6 ml, 40 mMol) Triethylamin werden portionenweise 2.3 g (20 mMol) 4-Piperidylethanol zugegeben und in einem Kolben mit CaCl-Rohr 24 h gerührt. Die Reaktion wird mit 5 ml Methanol gequencht und 1 h weitergerührt. Das RG wird einrotiert und über SiO₂ (Ø 5cm, Länge 15cm, Laufmittel EE/Hexan 3:2 mit 2% TEA) gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und eingengt. Es werden 3.1 g (13.5 mMol, 69 %) hellgelbes zähflüssiges Öl isoliert.



118

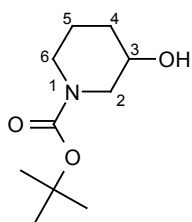
IR (cm⁻¹): 3443 (-OH), 1698 (Carbamat-CO), 1165 (Ester), 1021 (Alkohol-II-Bande)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 1.09-1.18 (m, -N-CH₂-CH_{eq}H_{ax}-CH-, J = 8.4 Hz); 1.46 (s, -CH₃); 1.53 (m, OH-CH₂-CH₂-, J = 6.4 Hz); 1.56-1.7 (m, -CH₂-CH-R₂-, -N-CH₂-CH_{eq}H_{ax}-CH-); 2.70 (t, br, -N-CH_{eq}H_{ax}-CH₂-, J = 12 Hz); 3.71 (t, -OH, J = 6.4 Hz); 4.10 (s, br, -N-CH_{eq}H_{ax}-CH₂-)

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): 28.85 (-CH₃); 32.52 (4); 32.94 (3, 5); 39.67 (2'); 44.35 (br, 2, 6); 60.6 (1'); 77.43 (-O-CO-C(CH₃)₃); 155.29 (-CO)

ISP-MS: neg: 288 (M + OAc)⁻

N-Boc-3-Hydroxypiperidin (119): Zu einer Lösung von 5.3 g (24 mMol) Di-tert-Butyl-Dicarboxylat in 10 ml CH₂Cl₂ und 4.1 g (6 ml, 40 mMol) Triethylamin werden portionenweise 2.0 g (20 mMol) 3-Hydroxypiperidin zugegeben und in einem Kolben mit CaCl-Rohr 24 h gerührt. Die Reaktion wird mit 5 ml Methanol gequencht und 1 h weitergerührt. Das RG wird einrotiert und über SiO₂ (Ø 5cm, Länge 15cm, Laufmittel EE/Hexan 3:2 mit 2% TEA) gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und eingengt. Es wird ein weißes Pulver erhalten. Nach Umfällung aus heissem EE und Zugabe von Hexan erhält man 1.7 g (8.5 mMol, 43 %) weißes nadeliges Pulver.



119

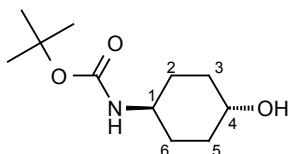
IR (cm⁻¹): 3466 (-OH), 2923, 2854 (aliph. CH), 1669 (Carbamat-CO), 1168 (Ester), 1073 (Alkohol-II-Bande)

¹H-NMR (450 MHz, CDCl₃): 1.47 (s, -CH₃); 1.49-1.89 (m, OH-CH-CH₂-CH₂-); 3.06, 3.70 (-N-CH₂-CH-OH); 3.12, 3.55 (-N-CH₂-CH₂); 3.74 (-O-CH-)

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): 22.79 (5); 28.81 (-CH₃); 32.95 (4); 44.63 (6); 50.96 (2); 66.58 (3); 80.12 (O-C-(CH₃)₃); 155.63 (-CO)

ISP-MS: neg: 260 (M + OAc)⁻

N-Boc-trans-4-Aminocyclohexanol (120): Zu einer Lösung von 5.3 g (24 mMol) Di-tert-Butyl-Dicarboxylat in 10 ml CH₂Cl₂, 5 ml DMF und 4.1 g (6 ml, 40 mMol) Triethylamin werden portionenweise 3.0 g (20 mMol) trans-4-Aminocyclohexanol x HCl zugegeben und in einem Kolben mit CaCl-Rohr 24 h gerührt. Die Reaktion wird mit 5 ml Methanol gequencht und 1 h weitergerührt. Das RG wird in 50 mM NaOH aufgenommen und 4x mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten org. Extrakte werden mit ges. NaCl-Lösung und H₂O gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und einrotiert. Man erhält ein weisses Pulver. Nach Umfällung aus heissem EE und nach Zugabe von Hexan erhält man 1.9 g (8.8 mMol, 45 %) weisses nadeliges Pulver.



120

IR (cm⁻¹): 3345 (-OH), 2925, 2855 (aliph. CH), 1682 (Carbamat-CO), 1208 (Ester), 1069 (Alkohol-II-Bande)

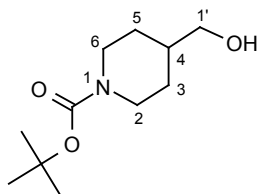
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.18-1.23 (m, OH-CH-(CH_{ax}H_{equ})₂-); 1.96-2.03 (m, OH-CH-(CH_{ax}H_{equ})₂-); 1.34-1.40 (m, -HN-CH-(CH_{ax}H_{equ})₂-); 1.96-2.03 (m, -HN-CH-(CH_{ax}H_{equ})₂-); 1.45 (-CH₃); 3.42 (s, br, HN-CH-R₂); 3.60 (m, HO-CH-R₂); 4.38 (s, br, -NH-)

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO): 28.8 (-CH₃); 31.55 (2, 6); 34.37 (3, 5); 49.27 (1); 70.22 (4); 79.64 (O-C-(CH₃)₃); 155.65 (-CO)

ISP-MS: neg: 274 (M + OAc)⁻

N-Boc-4-Piperidylmethanol (121): Zu einer Lösung von 5.3 g (24 mMol) Di-tert-Butyl-Dicarboxylat in 10 ml CH₂Cl₂ und 4.1 g (6 ml, 40 mMol) Triethylamin werden portionenweise 2.3 g (20 mMol) 4-Piperidylmethanol zugegeben und in einem Kolben mit CaCl-Rohr 24 h gerührt. Die

Reaktion wird mit 5 ml Methanol gequenchet und 1 h weitergerührt. Das RG wird einrotiert und über SiO₂ (Ø 5cm, Länge 15cm, Laufmittel EE/Hexan 3:2 mit 2% TEA) gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und eingengt. Es wird ein gelbes zähflüssiges Öl erhalten, welches nach ein paar Tagen im Kühlschrank ausfällt. Das Produkt wird in ca. 2 ml EE heiss gelöst und dazu werden 30 ml Hexan gegeben und über Nacht kühl gestellt. Der weisse Niederschlag wird abgenuscht und mit Hexan gewaschen. Die Prozedur wird mit der Mutterlauge wiederholt, bis kein Produkt mehr ausfällt. Es werden 1950 mg (9.1 mMol, 46 %) weisses Pulver isoliert.



121

IR (cm⁻¹): 3459 (-OH), 2976 - 2857 (aliph. CH), 1692 (Carbamat-CO), 1173 (Ester), 1042 (Alkohol-II-Bande)

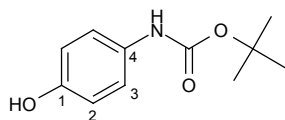
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.46 (s, -CH₃); 1.13-1.74 (m, -N-CH₂-CH₂-); 2.71 (t, br, N-CH_{ax}H_{equ}-, J = 10.8 Hz); 3.51 (m, HO-CH₂-CH_R); 4.0 (d, HO-CH₂-, J = 6.0 Hz); 4.13 (q, N-CH_{ax}H_{equ}-, J = 7.2 Hz)

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO): 28.85 (-CH₃); 29.01 (3, 5); 43,93 (br., 2, 6); 67.97 (4); 72.32 (1'); 79.72 (O-C-(CH₃)₃); 155.16 (-CO)

EI-MS:

ISP-MS: neg: 274 (M + OAc)⁻

N-Boc-4-Aminophenol (122): 10.9 g (0.1 mMol) 4-Aminophenol, 21.8 g Diboc (0.12 mMol) und 30.3 g (0.3 mMol) TEA werden mit 50 ml CH₂Cl₂ während 5 h bei RT in einem Kolben mit CaCl₂-Rohr gerührt. Gemäss DC-Kontrolle hat das Edukt vollständig abreagiert (R_f = 0.55, EE/Hexan 1:1). Es werden 20 ml MeOH zum Reaktionsgemisch gegeben und noch während 20 Min. weitergerührt. Danach wird das RG mit 200 ml H₂O versetzt und 4 x mit 100 ml EE extrahiert. Die organischen Phasen werden über MgSO₄ filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wird über SiO₂ gereinigt (EE/Hexan 1:2). Die Fraktionen, die das Produkt enthalten, werden zusammengegeben, am Rotationsverdampfer eingengt, heiss in wenig EE gelöst und durch Zugabe von Hexan ausgefällt. Man erhält 11.8 g (57 %) weisses nadeliges Pulver.



122

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): 1.44 (s, -CH₃); 6.63 (d, -CH-C(OH)-CH-, J = 6.9 Hz); 7.2 (d, -CH-C-(N-)-CH-, J = 8.7 Hz); 8.86 (s, br, -NH-); 8.98 (s, -OH)

¹³C-NMR: (75 MHz, DMSO): 27.4 (-CH₃); 78.25 (O-C-(CH₃)₃); 114.3/114.5 (-CH=CH-); 130.24 (=C-OH); 151.72 (=C-NH-); 152.62 (-NH-CO-O-)

ISP-MS: neg: 268 (M + OAc)⁻

ISP-MS: pos: 227 (M + NH₄)⁺

9.18 Optimierung der Reduktion vom Nitril zum Amidin

Kopplung von p-Cyanobenzoesäure zum modifizierten Harz

Zu 0.1 g (0.015 mMol) PEGA-Harz werden 31 mg (0.15 mMol) DCC, eine katalytische Menge DMAP, 20 μ l (0.15 mMol) Pyridin und 33 mg (0.15 mMol) p-Cyanobenzoesäure gegeben. Das Gemisch wird in 3 ml CH_2Cl_2 während 16 h bei RT geschüttelt.

IR (cm^{-1}): 2230 (-CN), 1727 (-COOR conj.)

9.18.1 Reduktion von an Harz gebundenem Benzonitril zum Benzamidin

Kopplung von 4-Cyanobenzoesäure ans Harz, **17 b** \rightarrow **50 a** und **50 b**

An 100 mg (20 μ Mol) Harz **17 b** wurde zuerst ein Fmoc-Glycin- oder ein Fmoc-Sarcosin-Baustein analog dem HATU-Kopplungsprotokoll gekoppelt. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde das Harz mit einer Lösung aus 0.4 ml 1 M HATU-Lösung (0.2 mMol), 30 μ l DIPEA (0.25 mMol) und 30 mg (0.2 mMol) 4-Cyanobenzoesäure versetzt und während 2 h bei RT geschüttelt.

MAS-NMR (400 MHz): bis 5 PEGA-Gerüst, 6.73; 7.39; 7.73; 8.16

IR: -CN bei 2230 cm^{-1}

MA: C: 53.8 %; H: 8.53 %; N: 5.11 %; S: 0.62 %

Wird das Harz 10 Minuten mit 25 % NH_4OH -Lösung behandelt, wird das Produkt als Amid abgespalten.

ISP-MS: 235 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

Reduktion zum harzgebundenen Benzamidin, **50 a** \rightarrow **51 a**

100 mg Harz **50 a** wurden mit 2 ml einer vorgängig hergestellten Lösung aus 1 g (20 mMol) NH_4Cl in 5 ml Toluol und 10 ml einer 2 M $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$ -Lösung (20 mMol) versetzt und bei RT 2 h geschüttelt. Danach wurde das Harz ausgiebig gewaschen, da sich ein weisser Niederschlag bildete. Durch mehrmaliges Waschen mit CH_3COOH wurde dieser wieder aus dem Harz heraus gelöst.

IR (cm^{-1}): -CN bei 2230 cm^{-1} nicht mehr sichtbar, -COOR bei 1727 cm^{-1} noch vorhanden

MAS-NMR (400 MHz): kein Unterschied zu **50 a**

9.18.2 Reduktion von Benzonitril zu Benzamidin

Reduktion von Benzonitril zu Benzamidin 52

Zu einer Suspension von 1.0 g (20 mMol) NH_4Cl in 5 ml Toluol werden bei 5°C unter Trockeneiskühlung langsam 10 ml einer 2 M $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$ -Lösung (20 mMol) zugetropft. Es entsteht eine klare Lösung. Nach erfolgter Zugabe wird auf RT erwärmt. Danach werden 310 μl (3 mMol) Benzonitril in 2 ml Toluol zu der Lösung gegeben und während 20 h auf 80°C erhitzt. Das gelbe RG wird in einer Suspension aus SiO_2 und CH_2Cl_2 während 5 Min. gerührt und danach abfiltriert. Danach wird die Lösung eingeeengt und über SiO_2 gereinigt (EE/ CH_2Cl_2 / CH_3OH 2:1:1). Die Ausbeute beträgt 390 mg (3.2 mMol) braun-viskoses Öl, die Reinheit ca. 70 %

^1H -NMR (300 MHz, DMSO): 7.56 – 7.91 (m, Aromat, 5 H); 9.3, 9.45 (2 s, 2H, Amidin)

Reduktion von 4-Cyanobenzoesäure zu 4-Amidinobenzoesäure 53

Zu einer Suspension von 1.0 g (20 mMol) NH_4Cl in 5 ml Toluol werden bei 5°C unter Trockeneiskühlung langsam 10 ml einer 2 M $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$ -Lösung (20 mMol) zugetropft. Es entsteht eine klare Lösung. Nach erfolgter Zugabe wird auf RT erwärmt. Danach werden 440 μl (3 mMol) 4-Cyanobenzoesäure in 2 ml Toluol zu der Lösung gegeben und während 20 h auf 80°C erhitzt. Das RG wird in einer Suspension aus SiO_2 und CH_2Cl_2 während 5 Min. gerührt und danach abfiltriert. Danach wird die Lösung eingeeengt und über SiO_2 gereinigt (EE/ CH_2Cl_2 / CH_3OH 2:1:1). Die Ausbeute beträgt 370 mg (0.25 mMol) gelb-viskoses Öl.

^1H -NMR (300 MHz, DMSO): 8.0 (d, Aromat, 2H, $J = 10.2$ Hz); 8.10 (d, Aromat, 2H, $J = 10.3$ Hz); 9.46, 9.6 (2s, 2H, Amidin)

9.19 Herstellung von Benzamidinen mittels der Pinner-Methode

Herstellung des Oxomidit-Intermediates 54

In eine mit Aceton/Trockeneis gekühlte Lösung von 20 % Ethanol in Diethylether oder CH_2Cl_2 wird HCl -Gas eingeleitet, bis die Lösung gesättigt ist. Zu 10 ml dieser Lösung werden 620 μl (6 mMol) Benzonitril gegeben. Die Lösung wird auf RT erwärmt und 14 h bei RT gerührt. Es werden

50 ml Diethylether zugegeben, wobei ein weisses Pulver ausfällt. Dieses wurde abfiltriert, mit Ether nachgewaschen und am HV getrocknet. Ausbeute 825 mg (4.5 mMol, 75 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): 1.48 (t, $-\text{CH}_3$, $J = 8.4$ Hz); 3.52 (s, br, $-\text{NH}$); 4.64 (q, $-\text{CH}_2$, $J = 8.4$ Hz); 7.64 (t, m- CH_2 , $J = 8.97$ Hz); 7.81 (t, p- CH_2 , $J = 8.9$ Hz); 8.17 (d, o- CH_2 , $J = 8.7$ Hz); 11.9 (s, br, $-\text{NH}^+\text{Cl}$)

ISP-MS: pos: 150 ($\text{M} + \text{NH}_4$) $^+$, 299 ($2\text{M} + \text{H}$) $^+$

IR (cm^{-1}): 2700 ($-\text{N}^+\text{H}$); 1632 ($-\text{C}=\text{N}-$); 1601, 1505 ($-\text{C}=\text{C}-\text{Aromat}$); 808, 699 (disubst. Aromat)

Herstellung des substituierten Benzamidins 57

100 mg (0.54 mMol) **54** wurden in 3 ml CH_3OH gelöst und 460 μl (5.4 mMol) Piperidin zugegeben. Reaktionskontrolle mittels DC ergab nach 20 Min. fast vollständigen Umsatz ($\text{EE}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Hex}$ 3:3:1; R_f **54** = 0.77, R_f **55** = 0.28). Das Lösungsmittel des RG wurde eingeeengt und das weisse nadelige Pulver am HV getrocknet.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): 1.4 – 1.7 (m, br, $-\text{CH}_2$); 2.82 (m, $-\text{CH}_2$); 3.45 (s, $-\text{CH}_2$); 7.09 (s, br, $-\text{NH}$); 7.5 – 7.6 (m, Aromat, 5H)

ISP-MS: pos: 189 ($\text{M} + \text{NH}_4$) $^+$

Herstellung des Benzamidins 52

100 mg des Oxoamidits **54** werden in 3 ml CH_3OH gelöst und 370 μl 25 % NH_3OH -Lösung (5.4 mMol) werden dazupipettiert (ergibt eine 2.7 % NH_3 -Lösung, pH 11). Nach DC-Kontrolle hat das Edukt nach 20 h vollständig abgereagert ($\text{EE}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Hex}$ 3:3:1; R_f **54** = 0.77, R_f **52** = läuft nicht). Das RG wurde eingeeengt, am HV getrocknet und mit $^1\text{H-NMR}$ analysiert. Man erkennt ein 3:2-Gemisch von Amidin **52** zu Oxoamidit **54**. Das Amidin ist nicht stabil und reagiert während des Einrotierens zurück zum Edukt.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): 7.58 – 7.90 (m, Aromat, 5 H); 9.4, 9.5 (2 s, 2H, Amidin)

Herstellung des Oxoamidits 56

50 mg (0.27 mMol) **54** wurden in 6 ml Methanol gelöst und mit 25 % NH_4OH -Lösung auf pH 10 eingestellt. Das RG wurde während 20 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde eingeeengt, das weisse Pulver am HV getrocknet und mit $^1\text{H-NMR}$ analysiert. Weder Amidin **52** noch Edukt **54**, sondern nur ein Methoxysubstituiertes Derivat ist zu sehen.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): 3.06 (s, $-\text{OCH}_3$); 7.4 – 7.9 (m, Aromat, 5H)

9.19.1 Reduktion von Benzonitril zu subst. Benzamidinen **59 - 70** durch Pinnermethode am Harz

Synthese von Oxoamidit **55** auf dem Harz

In eine mit Aceton/Trockeneis gekühlte Lösung von 20 % Ethanol in Diethylether oder CH_2Cl_2 wird HCl-Gas eingeleitet, bis die Lösung gesättigt ist. Zu einem Aliquot Harz mit gebundener Cyanobenzoesäure **50** wird ein grosser Überschuss von dieser sauren Lösung gegeben und das Gemisch während 2 h bei RT geschüttelt. Die Lösung kann auch bis auf $1/10$ verdünnt werden, ohne dass sich dies auf die Reaktion auswirkt. Das Harz wird dann alternierend mit Ethanol und Isopropanol gewaschen.

IR: $-\text{CN}$ bei 2230 cm^{-1} verschwindet quantitativ

Substitution des Oxoamidit zu den subst. Amidinen **59 - 70**

Zu einem Aliquot des Harzes mit Oxoamiditintermediat **55** wird ein grosser Überschuss an einer Lösung der in **Tabelle 21** aufgeführten Amine gegeben und das Harz wird bei RT während 20 h geschüttelt. Danach wird das Harz ausgiebig mit Isopropanol und Methanol gewaschen. Zur Analyse wird ein Aliquot jedes Harzes mit 25 % NH_4OH -Lösung behandelt und das abgespaltene Produkt mittels HPLC und MS untersucht. Ausführlichere Resultate zur Ausbeute und Reinheit sind auch in **Tabelle 21** dargestellt.

ISP-MS: **59 b**: -

60 b: 249 $(\text{M}+\text{H})^+$

61 b: 263 $(\text{M}+\text{H})^+$

62 b: -

63 b: 263 $(\text{M}+\text{H})^+$

64 b: -

65 b: 277 $(\text{M}+\text{H})^+$

66 b: 302 $(\text{M}+\text{H})^+$

67 b: 311 $(\text{M}+\text{H})^+$

68 b: 325 $(\text{M}+\text{H})^+$

69 b: 305 $(\text{M}+\text{H})^+$

70 b: 304 $(\text{M}+\text{H})^+$

9.20 Optimierung der Michael-Addition von N-Boc-Aminoalkoholen an Acrylsäuren/-amide

Kopplung von Acrylsäure an Disulfidlinker-substituiertes Harz, **15 b** → **73**

150 mg (0.03 mMol) Harz **15 b** werden mit 30 mg (0.45 mMol) Acrylsäure, 90 mg (0.45 mMol) DCC und 75 ml (0.9 mMol) Pyridin versetzt und das Reaktionsgefäß wird mit CH₂Cl₂ auf das anderthalbfache des Harzvolumens aufgefüllt. Das RG wird während 4 h bei RT geschüttelt, danach ausgiebig mit CH₂Cl₂ und Isopropanol gewaschen.

Michael-Addition von N-Boc-4-Hydroxypiperidin, **73** → **74**

180 mg (0.9 mMol) 4-Hydroxy-N-boc-Piperidin werden mit 22 mg (0.9 mMol) NaH in 3 ml THF versetzt und während 2 h gerührt. Nach 2 h oder wenn keinerlei Gasentwicklung mehr sichtbar ist, werden 150 mg (0.03 mMol) Harz **73** zugegeben. Das Harz wird während 20 h bei RT geschüttelt. Danach wird es ausgiebig gewaschen mit Isopropanol und CH₂Cl₂. Ein Aliquot dieses Harzes **74 a** wird 10 Minuten mit 25 % NH₄OH-Lösung behandelt und die Spaltlösung, die **74 b** enthält, mit ISP-MS analysiert.

ISP-MS: pos.: 274 (M+H)⁺, 296 (M+Na)⁺; neg.: 272 (M-H)⁺

Michael-Addition von N-Boc-4-Hydroxypiperidin, **73** → **75**

210 mg (0.9 mMol) N-Boc-4-Piperidylethanol werden mit 22 mg (0.9 mMol) NaH in 3 ml THF versetzt und während 2 h gerührt. Nach 2 h oder wenn keinerlei Gasentwicklung mehr sichtbar ist, werden 150 mg (0.03 mMol) Harz **73** zugegeben. Das Harz wird während 20 h bei RT geschüttelt. Danach wird es ausgiebig gewaschen mit Isopropanol und CH₂Cl₂. Ein Aliquot dieses Harzes **75 a** wird mit 25 % NH₄OH-Lösung behandelt und die Spaltlösung, die **75 b** enthält, mit MS analysiert.

ISP-MS: neg.: 300 (M-H)⁺

Michael-Addition von N-Boc-Hydroxypiperidin an Acrylsäureethylester, **76** - **79**

Synthese von Michael-Addukt **77**

100 mg (0.5 mMol) N-boc-4-Hydroxypiperidin werden mit 60 mg (2.5 mMol) NaH in 5 ml THF versetzt und während 2 h gerührt. Danach werden 65 mg (0.55 mMol) Ethylmethacrylat zugegeben und während 20 h unter Argon bei RT gerührt. Das RG wurde mit 0.1 M Zitronensäure in Diethylether extrahiert, die org. Phasen danach mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die eingeeengte org. Phase wurde über eine präparative DC (CH₃OH/CH₂Cl₂/EE 2:3:1) gereinigt. Die Fraktion mit R_f = 0.9 wurde abgekratzt, eluiert und eingeeengt. Man erhielt 90 mg (66 %) einer viskosen gelblichen Flüssigkeit, die nach NMR-Analyse ein 1:1 – Gemisch aus dem Umesterungsprodukt und dem Produkt **77** ist.

ISP-MS: 316 (M+H)⁺, 333 (M+NH₄)⁺

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.25 (t, CH₃-); 1.45 (s, -C(CH₃)₃); 1.6 – 1.9 (m, -CH₂-); 1.85 (d, CH₃-); 3.3 (q, -CHR(CO)); 4.1 (t, -O-CH₂-); 3.65 (m, -O-CH₂-CHR); 3.95 (m, -O-CHR₂-)

Synthese von Michael-Addukt 78

100 mg (0.5 mMol) N-boc-4-Hydroxypiperidin werden mit 60 mg (2.5 mMol) NaH in 5 ml THF versetzt und während 2 h gerührt. Danach wurden 65 mg (0.55 mMol) Ethylcrotonat zugegeben und während 20 h unter Argon bei RT gerührt. Das RG wurde mit 0.1 M Zitronensäure in Diethylether extrahiert, die org. Phasen danach mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die eingeeengte org. Phase wurde über eine präparative DC (CH₃OH/CH₂Cl₂/EE 2:3:1) gereinigt. Die Fraktion mit R_f = 0.9 wurde abgekratzt, eluiert und eingeeengt. Man erhält 45 mg (34 %) einer gelblichen viskosen Flüssigkeit

ISP-MS: 316 (M+H)⁺, 333 (M+NH₄)⁺

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.25 (t, CH₃-); 1.46 (s, -C(CH₃)₃); 1.59 (s, CH₃-CHR₂-); 1.65 (m, CO-CH₂-); 1.55 – 1.95 (m, Pip-CH₂-); 3.2, 3.7 (m, Pip-CH₂-); 4.05 (q, -O-CH₂-);

Synthese von Michael-Addukt 79

1.0 g (5.0 mMol) N-boc-4-Hydroxypiperidin werden mit 600 mg (25 mMol) NaH in 50 ml THF versetzt und während 2 h gerührt. Danach wurden 650 mg (5.5 mMol) Ethyltiglat zugegeben und während 20 h unter Argon bei RT gerührt. Das RG wurde mit 0.1 M Zitronensäure in Diethylether extrahiert, die org. Phasen danach mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die eingeeengte org. Phase wurde über eine SiO₂-Säule (CH₃OH/CH₂Cl₂/EE 2:3:1) gereinigt. Man erhält 850 mg (48 %) einer zähen gelbflüssigen Flüssigkeit. Die Reinheit nach HPLC beträgt 80 %.

ISP-MS: pos: 330 (M+H)⁺, 347 (M+NH₄)⁺; neg. 328 (M-H)⁺

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.20 (m, CH₃- und CH₃-CHR₂-); 1.75 (m, CO-CHR-); 1.55 – 1.95 (m, Pip-CH₂-); 2.5 (m, -O-CHR₂-); 3.2 – 3.7 (m, Pip-CH₂-); 4.05 (q, -O-CH₂-)

9.21 Reaktionssequenz **81** → **87**, **91** → **97**

Kopplung von Photolinker ans PEGA-Harz 13 a → 80

Zu 1.0 g (0.2 mMol) PEGA-Harz wurde eine voraktivierte Lösung aus 520 mg (1 mMol) Fmoc-geschütztem Photolinker, 2 ml 0.5 M Lsg. (2.0 mMol) HATU und 500 μ l (4.0 mMol) DIPEA gegeben und mit NMP auf das anderthalbfache Harzvolumen aufgefüllt. Das RG wurde 2 h bei RT geschüttelt, danach gewaschen und mit 20 % Piperidinlösung wurde während 20 Min. die Fmoc-Gruppe abgespalten und das Harz wiederum ausgiebig gewaschen.

ATR-IR (cm^{-1}): 1519 ($-\text{NO}_2$); 1280 (Arylether)

Kopplung von Acrylsäure bzw. Tiglinsäure ans Harz 80 → 81 bzw. 91

Zu je 1.0 g (0.2 mMol) Harz **80** wurde jeweils eine voraktivierte Lösung aus 100 mg (1.0 mMol) Tiglinsäure bzw. 75 mg (1.0 mMol) Acrylsäure in 2.0 ml 0.5 M (4.0 mMol) HATU und 500 μ l (4.0 mMol) DIPEA gegeben, mit NMP auf das anderthalbfache Harzvolumen aufgefüllt und während 2 h bei RT geschüttelt. Danach wurde das Harz ausgiebig mit NMP und Isopropanol und zuletzt mit CH_2Cl_2 gewaschen.

ATR-IR (cm^{-1}): 844 (Vinyl)

Michael-Addition, 81 → 82, 91 → 92

Zu 1.0 g (0.2 mMol) Harz **81** bzw. **91** wurde eine Lösung aus 200 mg (1.0 mMol) N-Boc-4-Hydroxypiperidin und 100 mg (2.0 mMol) NaH in 5 ml THF, welche zuvor 2 h bei RT gerührt worden war, zugegeben und bei 50°C während 14 h geschüttelt. Danach wurde das Harz ausgiebig mit CH_2Cl_2 und Isopropanol gewaschen.

1.0 g Harz trocken 0.2 mMol

ATR-IR (cm^{-1}): 844 verschwindet (Vinyl); 1280 (Ether); 1717 (Carbamat)

Kopplung von Fmoc-Phe an Boc-entschütztes Harz, 82 → 83 a, 92 → 93 a

Um **82** bzw. **83** zu entschützen, wurde das Harz während 1 h mit einer Lösung aus 95 % TFA, 3 % H₂O und 2 % TIPS behandelt und danach gut mit CH₂Cl₂ und Isopropanol gewaschen. Zuletzt wurde das Harz mit NMP gespült.

Zu 1.0 g (0.2 mMol) Harz **82** bzw. **83** wurde eine Lösung aus 460 mg (1.0 mMol) Fmoc-Phenylalanin, 2.0 ml 0.5 M (1.0 mMol) TPTU-Lösung und 500 µl (4.0 mMol) DIPEA gegeben und mit NMP auf das anderthalbfache Harzvolumen aufgefüllt. Das RG wurde bei RT während 2 h geschüttelt. Zur MS-Analyse wird ein Aliquot des Harzes in ACN/H₂O während 1 h mit UV bestrahlt und die Spaltlösung wird dann analysiert.

ATR-IR (cm⁻¹): 703 (monosubst. Aromat); 744 (orthosubst. Aromat); 763 (monosubst. Aromat); 1721 (Carbamat)

ISP-MS: **83 a**: 543 (M+H)⁺; **93 a**: 571 (M+H)⁺

Fmoc-Entschützung zum freien Amin, 83 → 83 b, 93 → 93 b

Das Harz **83 a** bzw. **93 a** wurde mit einer 20 % Piperidinlösung (in NMP) versetzt und während 20 Min. bei RT geschüttelt. Danach wurde das Harz ausgiebig mit Isopropanol und CH₂Cl₂ gewaschen.

ATR-IR (cm⁻¹): 744 verschwindet (orthosubst. Aromat); 1721 verschw. (Carbamat)

Kopplung von 4-Cyanobenzoesäure, 83 b → 84, 93 b → 94

Zu 1.0 g (0.2 mMol) Harz **83 b** bzw. **93 b** wurde eine Lösung aus 150 mg (1.0 mMol) 4-Cyanobenzoesäure, 2.0 ml 0.5 M (1.0 mMol) TPTU-Lösung und 500 µl (4.0 mMol) DIPEA zugegeben und mit NMP auf das anderthalbfache Harzvolumen aufgefüllt. Das RG wurde während 2 h bei RT geschüttelt, danach ausgiebig mit Isopropanol und CH₂Cl₂ gewaschen. Zur MS-Analyse wird ein Aliquot des Harzes in ACN/H₂O während 1 h mit UV bestrahlt und die Spaltlösung wird dann analysiert.

ATR-IR (cm⁻¹): 2229 (-CN); 770 (parasubst. Aromat)

ISP-MS: **84**: 450 (M+H)⁺; **94**: 478 (M+H)⁺

Pinnerreaktion zum Oxoamidit intermediat 84 → 85, 94 → 95

In eine mit Aceton/Trockeneis gekühlte Lösung von 20 % Ethanol in Diethylether wird HCl-Gas eingeleitet, bis die Lösung gesättigt ist. Zum Harz **84** bzw. **94** wird ein grosser Überschuss von

dieser sauren Lösung gegeben und das Gemisch während 2 h bei RT geschüttelt. Das Harz wird dann alternierend mit Ethanol, NMP und Isopropanol gewaschen.

ATR-IR (cm^{-1}): 2229 verschwindet (-CN); 734/770 ändert (parasubst. Aromat)

Pinnerreaktion vom Oxoamidit zu den substituierten Amidinen 85 → 86/87, 95 → 96/97

Danach werden jeweils 500 mg des Harzes **85** bzw. **95** mit 10 ml einer 10 % Benzylaminlösung bzw. mit 10 ml einer 10 % Morpholinlösung in CH_3OH versetzt und bei RT während 20 h geschüttelt. Danach wird das Harz gut mit CH_3OH und CH_2Cl_2 gewaschen. Zur MS-Analyse wird ein Aliquot des Harzes in $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ während 1 h mit UV bestrahlt und die Spatlösung wird dann analysiert.

ATR-IR (cm^{-1}): Änderungen bei 734 (parasubst. Aromat); 1275; 1717
ISP-MS: **86**: 557 ($\text{M}+\text{H}^+$); **97**: 565 ($\text{M}+\text{H}^+$)

9.22 Syntheseschritte der Lamifiban-Analoga-Bibliothek:

1. Kopplung von Sarcosin (N-Methylglycin) ans PEGA-Harz analog dem HATU-Kopplungsprotokoll

2a. Kopplung des Photolinkers ans Harz und Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe oder

2b. Kopplung des Disulfidlinkers ans Harz und Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe.

3a. Kopplung der Acrylsäure an den Photo-Linker (Amin-funktionalisiert)

Zu einem Äquivalent PEGA-Harz wird eine 10 Min. voraktivierte Lösung aus 5 Äquivalenten (substituierter) Acrylsäure, 5 Äquivalenten HATU und 10 Äquivalenten DIPEA in NMP gegeben und mit NMP auf das anderthalbfache Harzvolumen aufgefüllt. Das Reaktionsgefäß wird 3 h bei RT geschüttelt. Danach wird das PEGA-Harz alternierend mit Isopropanol und NMP gewaschen.

3b. Kopplung der Acrylsäure an den Disulfidlinker (Hydroxy-funktionalisiert)

Zu einem Äquivalent PEGA-Harz wird eine Lösung aus 5 Äquivalenten (substituierter) Acrylsäure, 10 Äquivalenten DCC, 10 Äquivalenten Pyridin und einer katalytischen Menge DMAP in CH_2Cl_2 gegeben. Das Reaktionsgefäß wird mit CH_2Cl_2 auf das anderthalbfache des Harzvolumens aufgefüllt und während 20 h bei RT geschüttelt. Das Harz wird danach je 3x mit CH_2Cl_2 und Methanol gewaschen.

Bsp.: Zu 50 mg (0.03 mMol) PEGA-Harz wird eine Lösung aus 11 mg (5 equ., 0.15 mMol) Acrylsäure, 62 mg (10 equ., 0.3 mMol) DCC, kat. Mengen DMAP und 25 μ l (10 equ., 0.3 mMol) Pyridin in 3 ml CH_2Cl_2 gegeben. Das RG wurde während 20 h bei RT geschüttelt. Das Harz wurde je 3x mit CH_2Cl_2 und Methanol gewaschen.

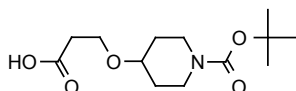
4. Michael-Addition eines N-Boc geschützten Aminoalkohols an den Acrylester auf dem Harz und Abspaltung der Boc-Schutzgruppe

Zu einem Äquivalent mit Acrylsäure beladenem PEGA-Harz, das zuvor einige Stunden am HV getrocknet worden ist, wird eine Suspension aus 30 equ. N-Boc-Aminoalkohol, 30 equ. NaH und 50 equ. 18-Crown-6 in wenig THF gegeben und soweit mit THF aufgefüllt, dass das Harz leicht mit LM überdeckt ist. Das Reaktionsgemisch wird 20 h bei RT geschüttelt. Danach wird das Harz mit THF, CH_2Cl_2 und Methanol gewaschen.

Die Suspension wird wie folgt vorbereitet. Das NaH wird mit trockenem THF 2x vom Öl gereinigt und abdekantiert, danach wird THF und der N-Boc-Aminoalkohol zugegeben und unter Argon einige Stunden gerührt um das Natriumalkoholat zu erhalten.

Bsp. 150 mg (0.03 mMol) mit SS-Linker und Acrylsäure modifiziertes PEGA-Harz werden am HV getrocknet. Dazu gibt man eine Suspension aus 180 mg (30 equ., 0.9 mMol) 4-Hydroxy-N-boc-Piperidin, 22 mg (30 equ., 0.9 mMol) NaH und 400 mg (50 equ., 1.5 mMol) 18-Crown-6 in 3 ml THF. Das RG wird während 20 h geschüttelt. Danach wird das Harz 3x mit THF, mit CH_2Cl_2 und Methanol gewaschen. Ein Aliquot (ca. 30 mg Harz) wurde in ein Eppendorf-Vial überführt und mit ACN gut gewaschen. Das Harz wurde mit 200 μ l 25 % $\text{NH}_3\text{OH}/\text{ACN}$ 1:1-Lösung versetzt und 1 h geschüttelt, danach wurde die Lösung mittels MS analysiert.

ISP-MS: neg: 272 (M-H)⁻; pos: 274 (M+H)⁺, 296 (M+Na)⁺



5. Kopplung einer Fmoc-Aminosäure analog dem HATU-Kopplungsprotokoll

6. Kopplung einer (substituierten) Cyanobenoessäure nach HATU-Kopplungsprotokoll

7. Transformation der Nitrilgruppe zum Imidoester

Das mit n-Amidinobenzoesäure modifizierte PEGA-Harz wird mit einem grossen Überschuss an mit HCl-Gas gesättigter Lösung aus Diethylether und Ethanol (im Verhältnis 4:1) versetzt und während 2 h bei RT geschüttelt. Das Harz wird danach alternierend mit NMP, Ethanol und Isopropanol gewaschen.

8. Transformation des Imidoesters zum (substituierten) Amidin.

Zum PEGA-Harz mit dem Imidoethylester-Intermediat wird je nach gewünschter Amidinsubstitution ein Überschuss an einer der folgenden ethanolischen Lösungen gegeben und 20 h bei RT geschüttelt:

| | |
|----------------------------|------------------------|
| für Amidin unsubstituiert: | 25% NH ₃ OH |
| für N-Methylamidin: | 20% Methylamin |
| für N-Dimethylamidin: | 20% Dimethylamin |
| für N-Ethylamidin: | 20% Ethylamin |
| für N-Ethylmethylamidin: | 50% Ethylmethylamin |
| für N-Piperidylamidin: | 20% Piperidin |
| für N-Benzylamidin | 10% Anilin |
| für N-Phenylamidin | 10% Benzylamin |
| für N-Morpholinoamidin: | 20% Morpholin |
| für N-Piperazinamidin: | 20% Piperazin |

Danach wird das Reaktionsgemisch alternierend mit Ethanol und Isopropanol gewaschen.

9.23 Synthese der Bibliotheken im Rahmen eines evolutionären Ansatzes

9.23.1 Synthese der 1. Bibliothek und Variation des Amidin-Bausteins

→ **Bibliotheken A, B, C und D**

11 g PEGA-Harz trocken (2.2 mMol) werden mit 2.5 g (11 mMol, 2.5 equ.) Photolinker, 4.2 g HATU (11 mMol, 5 equ.), 2.8 ml DIPEA (22 mMol, 10 equ.) und 30 ml NMP während 4 h bei RT geschüttelt. Danach wird das RG mit NMP und Isopropanol alternierend gewaschen. Ein negativ ausfallender Kaiser-Test liess auf eine vollständige Kopplung der Amine mit Photolinker schliessen. Mit 20 % Piperidin wird während 30 Minuten die Fmoc-geschützte Aminogruppe entschützt.

9.7 g Harz trocken (2 mMol) werden dann mit 720 mg (10 mMol, 5 equ.) Acrylsäure, 3.5 g (10 mMol, 5 equ.) HATU und 2.5 ml (20 mMol, 10 equ.) DIPEA in 30 ml NMP versetzt und während 2 h bei RT geschüttelt. Das Harz wird alternierend mit NMP und Isopropanol gewaschen. Ein negativ ausfallender Kaiser-Test liess wiederum auf keine freien 1° Amine und auf eine vollständige Kopplung der Acrylsäure schliessen.

6.4 g Harz (1.2 mMol) werden zuerst gründlich mit THF gespült und danach 2 h am HV getrocknet. Danach wird das Harz mit einer vorher aktivierten Lösung aus 1.2 g (6 mMol, 5 equ.) 4-Hydroxy-N-Boc-Piperidin und 580 mg (12 mMol, 10 equ.) NaH in 20 ml THF versetzt und während 5 h bei 50°C geschüttelt. Das Harz mit dem Michael-Addukt wird alternierend mit NMP und Isopropanol gewaschen. Zur Entschützung des Boc-geschützten Amins wird das Harz während einer Stunde mit einer Lösung aus TFA, H₂O und TIPS (95/3/2) behandelt. Danach wird das Harz wieder gewaschen.

4.0 g Harz (0.8 mMol) werden mit 1.8 g (4 mMol, 5 equ.) F-moc-Phenylalanin, 1.6 g (4 mMol, 5 equ.) HATU und 1.1 ml (8 mMol, 10 equ.) DIPEA in 12 ml NMP während 2 h bei RT geschüttelt. Ein Kaiser-Test zeigte keine 1° Amine an. Nach Entschützung des Phenylalanins mit 20 % Piperidinlösung in NMP während 20 Minuten und Waschen des Harzes mit NMP und Isopropanol war ein Kaiser-Test wieder positiv.

Je 1 g Harz (0.2 mMol) wird mit jeweils 120 mg (0.8 mMol, 5 equ.) 2-, 3- und 4-Cyanobenzoessäure resp. mit 140 mg (0.8 mMol, 5 equ.) 2-Cyano-5-Methoxybenzoessäure, 350 mg (0.8 mMol, 5 equ.) HATU und 250 µl (16 mMol, 10 equ.) DIPEA in 5 ml NMP während 2 h bei RT geschüttelt. Danach wird das Harz alternierend mit NMP und Isopropanol gewaschen. Ein negativ ausgefallener Kaiser-Test deutet auf eine vollständige Kopplung zum Cyanobenzoessäure-gekoppelten Produkt hin.

Die vier Aliquote Harz mit den gekoppelten Cyanobenzoessäuren werden gut mit Ethanol gewaschen und mit einem Überschuss an einer mit HCl-Gas gesättigten Lösung aus Diethylether und Ethanol (5/1) versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt. Danach wird das Harz wiederum mit Ethanol und Isopropanol gewaschen.

Die vier Aliquote Harz werden je in 10 Aliquote von 100 mg (0.02 mMol) separiert. Je ein Aliquot einer der vier Harzsorten wird mit einem Überschuss an einer ethanolischen Lösung der folgenden Amin-Lösungen umgesetzt und während 20 h bei RT geschüttelt:

| | |
|----------------------------|------------------------|
| für Amidin unsubstituiert: | 25% NH ₃ OH |
| für N-Methylamidin: | 20% Methylamin |
| für N-Dimethylamidin: | 20% Dimethylamin |
| für N-Ethylamidin: | 20% Ethylamin |
| für N-Ethylmethylamidin: | 50% Ethylmethylamin |
| für N-Piperidylamidin: | 20% Piperidin |
| für N-Benzylamidin | 10% Anilin |
| für N-Phenylamidin | 10% Benzylamin |
| für N-Morpholinoamidin: | 20% Morpholin |
| für N-Piperazinamidin: | 20% Piperazin |

9.23.2 Synthese der 2. Bibliothek und Variation des Aminosäure-Bausteins → **Bibliotheken E und F**

11 g PEGA-Harz trocken (2.2 mMol) werden mit 2.5 g (11 mMol, 2.5 equ.) Photolinker, 4.2 g HATU (11 mMol, 5 equ.), 2.8 ml DIPEA (22 mMol, 10 equ.) und 30 ml NMP während 4 h bei RT geschüttelt. Danach wird das RG mit NMP und Isopropanol alternierend gewaschen. Ein negativ ausfallender Kaiser-Test liess auf eine vollständige Kopplung der Amine mit Photolinker schliessen. Mit 20 % Piperidin wird während 30 Minuten die Fmoc-geschützte Aminogruppe entschützt.

9.7 g Harz trocken (2 mMol) werden dann mit 720 mg (10 mMol, 5 equ.) Acrylsäure, 3.5 g (10 mMol, 5 equ.) HATU und 2.5 ml (20 mMol, 10 equ.) DIPEA in 30 ml NMP versetzt und während 2 h bei RT geschüttelt. Das Harz wird alternierend mit NMP und Isopropanol gewaschen. Ein negativ

ausfallender Kaiser-Test liess wiederum auf keine freien 1° Amine und auf eine vollständige Kopplung der Acrylsäure schliessen.

6.4 g Harz (1.2 mMol) werden zuerst gründlich mit THF gespült und danach 2 h am HV getrocknet. Danach wird das Harz mit einer vorher aktivierten Lösung aus 1.2 g (6 mMol, 5 equ.) 4-Hydroxy-N-Boc-Piperidin und 580 mg (12 mMol, 10 equ.) NaH in 20 ml THF versetzt und während 5 h bei 50° C geschüttelt. Das Harz mit dem Michael-Addukt wird alternierend mit NMP und Isopropanol gewaschen. Zur Entschützung des Boc-geschützten Amins wird das Harz während 1 h mit einer Lösung aus TFA, H₂O und TIPS (95/3/2) behandelt. Danach wird das Harz wieder gewaschen.

Das Harz wird in 2 ml Spritzen in 35 Aliquote zu je ca. 100 mg Harz (0.02 mMol) verteilt. Die Harzaliquote wurden mit je 60 mg (ca. 0.1 mMol, 5 equ.) einer der unten aufgeführten Fmoc-geschützten Aminosäuren, sowie 40 mg (0.1 mMol, 10 equ.) HATU und 25 ml (0.2 μMol, 20 equ.) DIPEA in 2 ml NMP während 2 h bei RT geschüttelt. Das Harz wurde mit NMP gewaschen, mit 20 % Piperidinlösung in NMP entschützt und wiederum alternierend mit Isopropanol und Ethanol gewaschen.

Eingesetzte Aminosäuren:

- | | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| 1. Fmoc-L-Alanin | 18. Fmoc-D-Tyrosin |
| 2. Fmoc-C-alpha-methyl-L-Alanin | 19. Fmoc-L-Valin |
| 3. Fmoc- L-Arginin | 20. Fmoc-N-methyl-L-Valin |
| 4. Fmoc-L-Glutaminsäure | 22. Fmoc-D-Phenylalanin |
| 5. Fmoc-L-Glutamin | 23. Fmoc- P-Nitro-Phenylalanin |
| 6. Fmoc-L-Glycin | 24. Fmoc-L-Thienylalanin |
| 7. Fmoc-L-Histidin | 25. Fmoc-D-2-Thienylalanin |
| 8. Fmoc-L-Leucin | 26. Fmoc-D-Tyrosin |
| 9. Fmoc-N-methyl-L-Leucin | 27. Fmoc-D-1-Naphtylalanin |
| 10. Fmoc-L-Lysin | 28. Fmoc-D-2-Naphtylalanin |
| 11. Fmoc-L-Methionin | 29. Fmoc-L-2-Naphtylalanin |
| 12. Fmoc-L-Phenylalanin | 30. Fmoc-D-Methionin |
| 13. Fmoc-L-Prolin | 31. Fmoc-L-Methionin |
| 14. Fmoc-L-Serin | 32. Fmoc-D-Histidin |
| 15. Fmoc-L-Threonin | 33. Fmoc-L-Hydroxyprolin |
| 16. Fmoc L-Tryptophan | 34. Fmoc-D-Hydroxyprolin |
| 17. Fmoc-L-Tyrosin | 35. Fmoc-D-Glutaminsäure |

Die 35 Aliquote Harz werden je in 2 Spritzen verteilt. Je 50 mg Harz einer oben gekoppelten Aminosäure werden mit 8 mg (0.05 mMol) 4-Cyanobenzoessäure, die anderen 50 mg werden mit 9 mg (0.05 mMol) 2-Cyano-5-Methoxybenzoessäure und jeweils 20 mg (0.05 mMol, 5 equ.) HATU und 13 μl (0.1 mMol, 10 equ.) DIPEA versetzt und mit NMP auf 1 ml aufgefüllt. Die Harzproben werden während 2 h bei RT geschüttelt. Danach wird das Harz alternierend mit NMP und Isopropanol gewaschen.

Die 2 x 35 Aliquote Harz mit den beiden gekoppelten Cyanobenzoessäuren werden gut mit Ethanol gewaschen und mit einem Überschuss an einer mit HCl-Gas gesättigten Lösung aus Diethylether und Ethanol (5/1) versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt. Danach wird das Harz wiederum mit Ethanol und Isopropanol gewaschen.

Die Harzaliquote mit der gekoppelten 4-Cyanobenzoessäure werden dann mit einem Überschuss an ethanolischer 10 % Anilinlösung, die Harzaliquote mit der 2-Cyano-5-Methoxybenzoessäure werden mit einem Überschuss an 50 % Ethylmethylaninlösung versetzt. Die Proben werden 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt, danach alternierend mit Isopropanol und Ethanol gewaschen.

9.23.3 Synthese der 3. Bibliothek und Variation des Aminoalkohol-Bausteins → **Bibliotheken G und H**

11 g PEGA-Harz trocken (2.2 mMol) werden mit 2.5 g (11 mMol, 2.5 equ.) Photolinker, 4.2 g HATU (11 mMol, 5 equ.), 2.8 ml DIPEA (22 mMol, 10 equ.) und 30 ml NMP während 4 h bei RT geschüttelt. Danach wird das RG mit NMP und Isopropanol alternierend gewaschen. Ein negativ ausfallender Kaiser-Test liess auf eine vollständige Kopplung der Amine mit Photolinker schliessen. Mit 20 % Piperidin wird während 30 Minuten die Fmoc-geschützte Aminogruppe entschützt.

9.7 g Harz trocken (2 mMol) werden dann mit 720 mg (10 mMol, 5 equ.) Acrylsäure, 3.5 g (10 mMol, 5 equ.) HATU und 2.5 ml (20 mMol, 10 equ.) DIPEA in 30 ml NMP versetzt und während 2 h bei RT geschüttelt. Das Harz wird alternierend mit NMP und Isopropanol gewaschen. Ein negativ ausfallender Kaiser-Test liess wiederum auf keine freien 1° Amine und auf eine vollständige Kopplung der Acrylsäure schliessen.

Es werden 2x 11 Spritzen mit jeweils ca. 100 mg (0.02 mMol) Harz (trocken) gefüllt. Dann wird das Harz zuerst gründlich mit THF gespült und danach 2 h am HV getrocknet. Danach werden die Harzaliquote je mit einer voraktivierten Lösung aus 50 mg (ca. 0.2 mMol, 10 equ.) einer der unten aufgeführten N-Boc-Aminoalkohole und 10 mg (0.4 mMol, 20 equ.) NaH in 0.5 ml THF versetzt und während 5 h bei 50°C geschüttelt. Danach wird das Harz mit dem Michael-Addukt alternierend mit NMP und Isopropanol gewaschen. Zur Entschätzung des Boc-geschützten Amins wird das Harz während einer Stunde mit einer Lösung aus TFA, H₂O und TIPS (95/3/2) behandelt. Danach wird das Harz wieder gewaschen.

Eingesetzte Verbindungen:

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| 1. 3-Pyrrolidinol | 7. 4-Hydroxymethyl-Piperidin |
| 2. 2-Piperidineethanol | 8. 2-Aminoethanol |
| 3. 2-Piperidinemethanol | 9. 4-Hydroxypiperidine |
| 4. 4-Piperidineethanol | 10. 1,4-Phenylendiamin |
| 5. 3-Hydroxypiperidine | 11. 4-Hydroxyanilin |
| 6. Trans-4-Aminocyclohexanol | |

Eine Serie der Proben wird nun mit 60 mg (ca. 0.1 mMol, 5 equ.) Fmoc-L-2-Thienylalanin, die andere mit 60 mg (ca. 0.1 mMol, 5 equ.) D-Arginin, sowie jeweils mit 40 mg (0.1 mMol, 10 equ.) HATU und 25 µl (0.2 mMol, 20 equ.) DIPEA in 1 ml NMP für 2 h bei RT geschüttelt. Das Harz wird mit NMP gewaschen und die Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidinlösung in NMP entschützt. Danach wird wiederum alternierend mit Isopropanol und Ethanol gewaschen.

Das Harz der oben gekoppelten Aminosäuren wird mit 16 mg (0.1 mMol) 4-Cyanobenzoessäure und jeweils 40 mg (0.1 mMol, 5 equ.) HATU und 25 µl (0.2 mMol, 10 equ.) DIPEA versetzt und mit

NMP auf 1 ml aufgefüllt. Die Harzproben werden während 2 h bei RT geschüttelt. Danach wird das Harz alternierend mit NMP und Isopropanol gewaschen.

Die 22 Aliquote Harz mit den beiden gekoppelten Cyanobenzoesäuren werden gut mit Ethanol gewaschen und mit einem Überschuss an einer mit HCl-Gas gesättigten Lösung aus Diethylether und Ethanol (5/1) versetzt und während 2 h bei RT geschüttelt. Danach wird das Harz wiederum mit Ethanol und Isopropanol gewaschen.

Die Harzaliquote mit der gekoppelten 4-Cyanobenzoesäure werden dann mit einem Überschuss an ethanolischer 10 % Anilinlösung versetzt. Die Proben werden 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt, danach alternierend mit Isopropanol und Ethanol gewaschen.

Die Serie mit L-2-Thienylalanin als Aminosäurebaustein wurde auf verschiedenen Stufen mittels ATR-IR untersucht. Die Daten sind tabellarisch aufgeführt:

| Variierter Baustein | Stufe | | | | |
|--|--|----------------------------|---|--|--------------------------|
| | N-Boc-Aminoalkohol addiert | N-Boc entschützt | Fmoc-Aminosäure gekoppelt | Cyanobenzoesäure gekoppelt | 1. Stufe Pinner-Reaktion |
| 1. 3-Pyrrolidinol | 1617, 1541, 1297, 1225, 850 | 1726, 1201 | 1726, 1537, 1201 ^{b)} , 760, 744 | 2229, 760 ^{b)} , 744 ^{b)} | a) |
| 2. 2-Piperidyl-ethanol | 1617, 1541, 1297, 850 | 1201, 799, 725, | 1201 ^{b)} , 775, 750 | 2238, 700-800 ^{c)} | a) |
| 3. 2-Piperidyl-methanol | 1617, 1541, 1322, 1297, 850, 777 | 1201, 799, 725 | 1725, 1201 ^{b)} , 775, 750 | 2230, 844, 775 ^{b)} , 750 ^{b)} | a) |
| 4. 4-Piperidyl-ethanol | 1617, 1541, 1323, 1297, 850, | 1325, 1201, 843, 799, 717 | 1201 ^{b)} , 777, 750 | 2233, 1725, 700-800 ^{c)} | a) |
| 5. 3-Hydroxy-piperidine | 1617, 1545, 1324, 1297, 850, 776 | 1323, 1201, 800, 743 | 1201 ^{b)} , 776, 743 | 2231, 785, 776/743 ^{b)} | a) |
| 6. Trans-4-Aminocyclohexanol | 1617, 1545, 1300, 850, 778 | 1323, 1201, 719 | 1201 ^{b)} , 776, 750 | 2230, 1725 | a) |
| 7. 4-Hydroxy-methylpiperidin | 1617, 1545, 1300, 850, 778 | 1543, 1370, 1201, 798, 719 | 1534, 1201 ^{b)} , 776, 763 | 2227, 776/763 ^{b)} | a) |
| 8. 2-Aminoethanol | 1617, 1541, 1518, 1297, 1225, 850 | 1545, 1277, 1201, 799, 719 | 1545, 1277, 1201 ^{b)} , 769, 758 | 2231, 1277, 700 - 800 ^{c)} | a) |
| 9. 4-Hydroxy-piperidine | 1617, 1540, 1300, 850 | 1542, 1201, 800, 719 | 1201 ^{b)} , 770, 744 | 2236, 700 - 800 ^{c)} | a) |
| 10. 1,4-Phenylendiamin | 1716, 1617, 1541, 1516, 1297, 850, 764 | 1201, 798, 720 | 1717, 1615, 1201 ^{b)} , 761, 742 | 2229, 1717, 761/742 ^{b)} | a) |
| 11. 4-Hydroxyanilin | 1716, 1617, 1541, 1516, 1297, 850, 764 | 1217, 1202, 800, 760, 718 | 1717, 1546, 1202 ^{b)} , 761, 743 | 2229, 1717 (dis.), 1520, 700 - 800 ^{c)} | a) |
| a) die Absorption bei ca. 2230 cm ⁻¹ (-CN) verschwindet. b) Absorption verschwindet c) Veränderung im Absorptionsmuster | | | | | |

9.23.4 Synthese der 4. Bibliothek und Variation des Acrylbausteins → **Bibliotheken I und J**

11.0 g PEGA-Harz trocken (2.2 mMol) werden mit 2.5 g (11 mMol, 2.5 equ.) Photolinker, 4.2 g HATU (11 mMol, 5 equ.), 2.8 ml DIPEA (22 mMol, 10 equ.) und 30 ml NMP während 4 h bei RT geschüttelt. Danach wird das RG mit NMP und Isopropanol alternierend gewaschen. Ein negativ ausfallender Kaiser-Test liess auf eine vollständige Kopplung der Amine mit Photolinker schliessen. Mit 20 % Piperidin wird während 30 Minuten die Fmoc-geschützte Aminogruppe entschützt.

2.0 g Harz trocken (0.4 mMol) werden dann in 20 Aliquote zu 100 mg (0.02 mMol) Harz (trocken) verteilt. Diese wurden je mit 10 Äquivalenten einer der unten aufgeführten Acrylsäuren- und Derivate (0.2 mMol), 80 mg HATU (10 equ., 0.2 mMol) und 50 µl DIPEA (20 equ., 0.4 mMol) in 1 ml NMP versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt. Das Harz wird dann alternierend mit NMP und Isopropanol gewaschen. Ein negativ ausfallender Kaiser-Test liess wiederum auf keine freien 1° Amine und auf eine vollständige Kopplung der Acrylsäure schliessen.

Eingesetzte Verbindungen:

1. Acrylsäure
2. Methacrylsäure
3. trans-Styrylessigsäure
4. iso-Butylacrylsäure
5. 2-(Brommethyl)-Acrylsäure
6. 6-Furansäure
7. 3-trans-Hexensäure
8. Tiglinsäure
9. 1-Cyclohexensäure
10. 1-Cyclopentensäure

Das Harz wird gründlich mit THF gespült und danach 2 h am HV getrocknet. Danach wird je eine Serie der Harzaliquote mit einer voraktivierten Lösung aus 50 mg (ca. 0.2 mMol, 10 equ.) N-Boc-4-Hydroxymethylpiperidin resp. mit N-Boc-para-Aminophenol und 10 mg (20 equ., 0.4 mMol) NaH in 1 ml THF versetzt und während 5 h bei 50° C geschüttelt. Danach wird das Harz mit dem Michael-Addukt alternierend mit NMP und Isopropanol gewaschen. Zur Entschützung des Boc-geschützten Amins wird das Harz während einer Stunde mit einer Lösung aus TFA, H₂O und TIPS (95/3/2) behandelt. Danach wird das Harz wieder gewaschen.

Die Proben beider Serien werden nun je mit 120 mg (0.2 mMol, 5 equ.) Fmoc-L-2-Thienylalanin, sowie 80 mg (0.4 mMol, 10 equ.) HATU und 50 µl (0.4 µMol, 20 equ.) DIPEA in 2 ml NMP für 2 h bei RT geschüttelt. Das Harz wird mit NMP gewaschen, mit 20 % Piperidinlösung in NMP entschützt und wiederum alternierend mit Isopropanol und Ethanol gewaschen.

Das Harz der oben gekoppelten Aminosäuren wird mit 30 mg (0.2 mMol) 4-Cyanobenzoesäure und jeweils 80 mg (0.2 mMol, 5 equ.) HATU und 50 µl (0.4 mMol, 10 equ.) DIPEA versetzt und mit NMP auf 2 ml aufgefüllt. Die Harzproben werden während 2 h bei RT geschüttelt. Danach wird das Harz alternierend mit NMP und Isopropanol gewaschen.

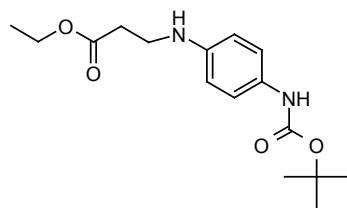
Die 20 Aliquote Harz mit der gekoppelten Cyanobenzoesäuren werden gut mit Ethanol gewaschen und mit einem Überschuss an einer mit HCl-Gas gesättigten Lösung aus Diethylether und Ethanol (5/1) versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt. Danach wird das Harz wiederum mit Ethanol und Isopropanol gewaschen.

Die Harzaliquote mit den gekoppelten 4-Cyanobenzoesäure werden dann mit einem Überschuss an ethanolischer 10 % Anilinlösung versetzt. Die Proben werden 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt, danach alternierend mit Isopropanol und Ethanol gewaschen.

9.24 Synthese einiger „aktiver“ Verbindungen aus dem Screening

Synthese von 1,4-(N'-Ethyl-(2'-Ethylacetat))-(N-tert-Butyl)-phenylendiamin 112

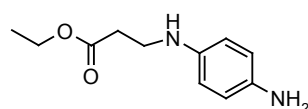
10.0 g (480 mMol) N-Boc-1,4-phenylendiamin wird mit 4.8 g (520 mMol) Acrylsäureethylester in 200 ml Eisessig versetzt und während 20 h bei 70°C unter Rückfluss gerührt. Das Edukt hat nach DC-Kontrolle vollständig abreagiert (R_f Edukt in EE/Hexan 1:1 = 0.33). Vom Reaktionsgemisch wurde ein DC gemacht und die getrennten Produkte abgekratzt, eluiert und mittels MS analysiert. Es sind zwei ca. gleich grosse Flecken vorhanden, mit R_f = 0.66 das zweifach addierte Michael-Addukt und mit R_f = 0.55 das gewünschte Michael-Addukt. Das gesamte Reaktionsgemisch wurde über eine SiO₂-Säule (15 cm Länge, 10 cm Durchmesser) mit Hex/EE 4:1 gereinigt. Die relevanten Säulenfraktionen wurden vereinigt und eingengt. Nach Trocknung am HV erhielt man 4.1 g (28 %) hellbraunen kristallinen Festkörper.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 1.18 (t, $-\text{CH}_3$, $J = 7.2$ Hz); 1.4 (s, t-Bu); 2.49 (m, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 3.22 (q, $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J = 6$ Hz); 4.05 (q, $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-$, $J = 6.9$ Hz); 5.25 (s, br, $\text{CH}_2-\text{NH}-$); 6.467 (d, $\text{CO}-\text{NH}-\text{Aromat}$, $J = 9$ Hz); 7.13 (d, $\text{CH}_2-\text{NH}-\text{Aromat}$, $J = 8.4$ Hz); 8.8 (s, br, $\text{CO}-\text{NH}-$)
 $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3): 24.8 – 27.6; 31.9; 58; 76.3; 109.6; 110.39; 11.16; 127; 142.,2;
 151.2; 169.8
 ISP-MS: pos: 309 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

Synthese von 1,4-(N'-Ethyl-(2'-Ethylacetat))-phenylendiamin 113

Zu 4.0 g **112** (13 mMol) werden 200 ml 50% TFA (in CH_2Cl_2) gegeben und während 1 h bei RT gerührt. Das RG wird eingengt und man erhält 2.4 g (90 %) gelbes kristallines Produkt.



113

IR (cm^{-1}): 3360 ($-\text{NH}_2$), 1719 (Ester), 1613 (Aromat), 1245 (Ester), 821 (para-subst. Aromat)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 1.18 (t, $-\text{CH}_3$, $J = 7.2$ Hz); 2.49 (m, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 3.22 (q, $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J = 6$ Hz); 4.05 (q, $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-$, $J = 6.9$ Hz); 6.7 (d, $\text{CO}-\text{NH}-\text{Aromat}$, $J = 9$ Hz); 7.07 (d, $\text{CH}_2-\text{NH}-\text{Aromat}$, $J = 10.5$ Hz)

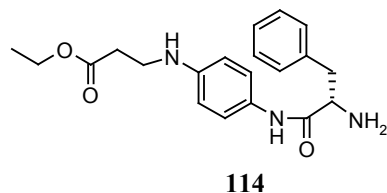
$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3): 33.63; 109.93; 113.77; 117.61; 121.45; 157.97 – 159.46; 171.75
 ISP-MS: pos: 209 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

Synthese von 1,4-(N'-Ethyl-(2'-Ethylacetat))-(N-Phenylalanin)-phenylendiamin 114

250 mg **113** (0.85 mMol) werden mit einer voraktivierten Lösung aus 460 mg (1.2 mMol) Fmoc-Phe-OH, 910 mg (2.4 mMol) HATU und 620 mg (4.8 mMol) DIPEA in 10 ml CH_2Cl_2 versetzt und 14 h bei RT gerührt. Nach DC-Analyse hat das Edukt vollständig abgereagert. Das Fmoc-geschützte Produkt wurde nicht isoliert, sondern gleich weiter verwendet.

Zum Reaktionsgemisch wurden 3 ml Piperidin gegeben und das RG wurde während 20 Minuten bei RT gerührt. Danach wurden zum RG 30 ml CH_2Cl_2 gegeben und die organische Phase wurde 2 x mit 0.1 M Zitronensäure, 2 x mit 0.1 M NaHCO_3 und 2 x mit ges. NaCl-Lösung extrahiert. Die org. Phase wurde eingengt und mittels einer SiO_2 -Säule (Laufmittel Hexan/EE 1:1 und EE/ CH_2Cl_2 /MeOH 3:3:1) chromatographisch getrennt. Die Säulenfraktionen mit dem Produkt

(R_f in EE/ CH₂Cl₂/MeOH 3:3:1 = 0.38) wurden vereinigt und eingengt. Es wurden 290 mg (0.82 mMol, 68 %) gelbes Öl erhalten.



IR (cm⁻¹): 3280 (-NH₂); 1719 (Amid I); 1719; 1513; 821; 720

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.18 (t, -CH₃, J = 7.2 Hz); 2.53 (d, Phenyl-CH₂-); 2.68 (t, -NH-CH₂-); 3.25 (m, CO-CH₂-); 4.85 (s, br, -NH); 5.48 (t, -CO-CH₂-NH-); 6.52 (d, -CO-NH-(CH₂)₂-); 7.2 – 7.32 (m, aromatische CH, 7H)

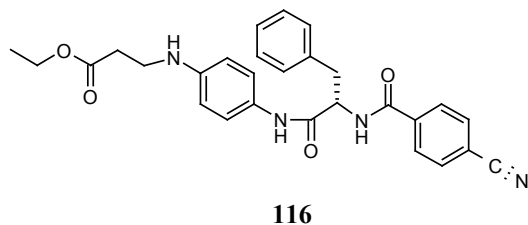
ISP-MS: pos: 356 (M + H)⁺, 378 (M + Na)⁺, 713 (2M + H)⁺

Synthese von 1,4-(N'-Ethyl-(2'-Ethylacetat))-(N-Phe-p-Cyanobenzoesäure)-phenylendiamin 116

290 mg **114** (0.82 mMol) werden mit einer voraktivierten Lösung aus 165 mg 4-Cyanobenzoesäure (0.93 mMol), 650 mg TPTU (1.7 mMol) und 440 mg DIPEA (3.4 mMol) versetzt und in 20 ml CH₂Cl₂ während 14 h bei RT gerührt. Das LM wurde am Rotationsverdampfer eingengt und das Gemisch wurde über Silicagel gereinigt (Laufmittel: zuerst Hex/EE 1:1, dann EE/CH₂Cl₂ 1:1). Das bräunliche dickflüssige Produkt wurde in EE heiss gelöst und durch Zugabe von Diethylether ausgefällt, abzentrifugiert und mit Diethylether nachgewaschen. Es wurden 250 mg (0.52 mMol, 63 %) hellgelbes Pulver erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.15 (t, CH₃-CH₂-, J = 7.1 Hz, 2H); 2.54 (t, -NH-CH₂-CH₂-, J = 6.7 Hz, 2H); 3.3 (t, -NH-CH₂-CH₂-, J = 6.75 Hz, 2H); 4.1 (q, CH₃-CH₂-, J = 7.1 Hz, 2H); 4.85 (m, Ar-NH-CH₂-, 1H); 5.45 (s, br, -CO-CH₂-NH-, J = 5.4 Hz, 1H); 6.54 (d, -CH₂-NH-(CH₂)₂-, J = 9.0, 2H); 7.1 – 7.4 (m, Ar, 7H); 7.9 (s, Ar, 4H), 8.99 (d, -CH₂-NH-CO-, J = 8.4, 1H); 9.84 (s, Ar-NH-CO-, 1H)

ISP-MS: pos: 485 (M + H)⁺



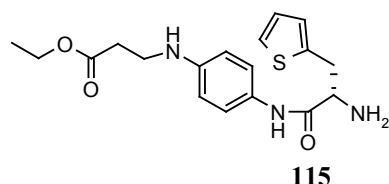
Synthese von 1,4-(N'-Ethyl-(2'-Ethylacetat))-(N-Thienylalanin)-phenylendiamin 115

250 mg **113** (0.85 mMol) werden mit einer voraktivierten Lösung aus 470 mg (1.2 mMol) Fmoc-Thienylalanin, 910 mg (2.4 mMol) TPTU und 620 mg (4.8 mMol) DIPEA in 10 ml CH₂Cl₂ versetzt und 14 h bei RT gerührt. Nach DC-Analyse hat das Edukt vollständig abgereagert. Das RG wurde direkt über SiO₂ chromatographisch gereinigt (EE/CH₂Cl₂/CH₃OH 3:3:1). Das Produkt (DC: R_f = 0.85) wurde eingengt und am HV getrocknet. Die Ausbeute betrug 530 mg an einem hellbraunen viskosen Öl.

ISP-MS: 601 (M+H)⁺

Das Fmoc-geschützte Produkt wurde gleich weiter eingesetzt und während 20 Minuten mit 20 ml einer 20 % Piperidinlösung bei RT behandelt. Danach wurden zum RG 30 ml CH₂Cl₂ gegeben und die organische Phase wurde 2 x mit 0.1 M Zitronensäure, 2 x mit 0.1 M NaHCO₃ und 2 x mit ges. NaCl-Lösung extrahiert. Das RG wurde eingengt und über SiO₂ gereinigt (EE/CH₂Cl₂/CH₃OH/AcOH 3:3:1:1). Die Ausbeute an **115** betrug 290 mg (0.8 mMol, 94 %) an einem hellbraunen viskosen Öl.

ISP-MS: 362 (M+H)⁺

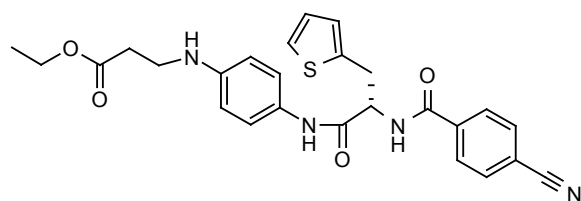


Synthese von 1,4-(N'-Ethyl-(2'-Ethylacetat))-(N-Thienylalanin-p-Cyanobenzoesäure)-phenylendiamin **117**

250 mg **115** (0.69 mMol) werden mit einer voraktivierten Lösung aus 180 mg 4-Cyanobenzoesäure (1.2 mMol), 910 mg TPTU (2.4 mMol) und 620 mg DIPEA (4.8 mMol) versetzt und in 20 ml CH₂Cl₂ während 14 h bei RT gerührt. Danach wurden zum Reaktionsgemisch 30 ml CH₂Cl₂ gegeben und die organische Phase wurde mit 0.1 M Zitronensäure, 0.1 M NaHCO₃ und mit ges. NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ filtriert, am Rotationsverdampfer eingengt und über SiO₂ gereinigt (Hex/EE 1:1). Das Produkt (DC: R_f = 0.6) war nach HPLC-Analyse nur 70 % rein und wurde noch einmal über eine Source RPC 15-Säule gereinigt. Die Fraktionen mit der korrekten Masse wurden vereinigt und lyophilisiert. Man erhält 140 mg (0.28 mMol, 40 %) hellgelbes Pulver.

ISP-MS: 491 (M+H)⁺, 982 (2M+2H)⁺

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.18 (t, CH₃-CH₂-, J = 7.3 Hz, 2H); 1.56 (m, -CH₂-CHR₂-, 2H); 2.54 (t, -NH-CH₂-CH₂-, J = 6.7 Hz, 2H); 3.25 (t, -NH-CH₂-CH₂-, J = 6.75 Hz, 2H); 4.1 (q, CH₃-CH₂-, J = 7.1 Hz, 2H); 4.8 (m, Ar-NH-CH₂-, 1H); 5.45 (s, br, -CO-CHR-NH-, 1H); 6.54 (d, -CH₂-NH-(CH₂)₂-, J = 8.82, 2H); 6.9 – 7.0 (m, Thiophen-C=CH-CH=CH-, 2H); 7.25 – 7.34 (m, Thiophen-S-CH₂=CH₂-, 1H und -CO-NH-(CH₂)₂-, 3H); 7.95 (CN-(CH₂)₂-, J = 8.4 Hz, 2H); 8.02 (NH-CO-(CH₂)₂-, J = 8.4 Hz, 2H); 9.1 (d, -CHR-NH-CO-, J = 8.2, 1H); 9.9 (s, Ar-NH-CO-, 1H)



117

Synthese von 1,4- (N'-Ethyl-(2'-Amid))- (N-(L-Phe)-p-Cyanobenzoesäure)-phenylendiamin 100

2.0 g Rink-Amid AM Harz (1.4 mMol) wurde mit einer voraktivierten Lösung aus 720 mg (14 mMol) Acrylsäure, 5.2 g (14 mMol) TPTU und 1.8 ml (28 mMol) DIPEA in 10 ml NMP versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt. Danach wurde das Harz mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

IR (cm^{-1}): 820 (Vinyl)

Das Harz wurde in einen 500 ml Rundkolben überführt und mit 2.2 g (28 mMol) 4-Aminoanilin in 100 ml $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:1 während 14 h bei 50°C unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde das Harz mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

IR (cm^{-1}): 820 verschwindet

Das Harz wurde mit einer voraktivierten Lösung aus 2.7 g (7 mMol) Fmoc-Phenylalanin, 2.6 g (7 mMol) TPTU und 0.9 ml (14 mMol) DIPEA in 10 ml NMP versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt. Danach wurde das Harz mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

IR (cm^{-1}): 1723, 1750 (Carbamat), 1122; 871, 742, 760 (ortho-disubst. Aromat)

Das Harz wurde mit einer 20 % Piperidinlösung während 20 Minuten bei RT behandelt und wiederum mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

IR (cm^{-1}): 1723, 1750, 1122, 871, 742, 760 verschwinden

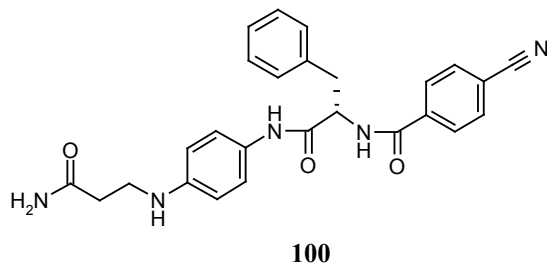
Das Harz wurde mit einer voraktivierten Lösung aus 1.1 g (7 mMol) 4-Cyanobenzoesäure, 2.6 g (7 mMol) TPTU und 1.7 ml (14 mMol) DIPEA in 10 ml NMP versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt. Danach wurde das Harz mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

IR (cm^{-1}): 2231 (Aryl-CN); 755 (monosubst. Aromat)

Mit 50 ml einer 50 % TFA Lösung in CH_2Cl_2 wurde während 1 h das Produkt vom Harz abgespalten. Durch Zugabe von 1 Liter Diethylether wurde das Produkt ausgefällt. Das Produkt wurde abfiltriert und mittels FPLC über Source-Material gereinigt.

IR (cm^{-1}): 2230 (Aryl-CN); 1640 (Amid I), 1550 (Amid II)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 2.5 (br, $\text{Ar-NH-CH}_2\text{-2H}$); 3.1 (m, $\text{CO-CH}_2\text{-}$, 2H); 3.7 (d, $\text{Ar-CH}_2\text{-CHR}_2\text{-}$, 2H); 4.6 ($-\text{CO-CHR-NH-}$, 1H); 6.9 – 8.0 (Aryl-H, 13 H); 9.05 (m, Ar-NH-CO- , 1H); 9.1 ($\text{CO-NH-CHR}_2\text{-}$, 1H)
 ISP-MS: pos: 456 (M+H)⁺, 473 (M+Na)⁺



Synthese von 1,4- (N'-Ethyl-(2'-Carboxy))-(N-(L-Phe)-p-Amidinobenzoessäure)-phenylendiamin **101** und 1,4- (N'-Ethyl-(2'-Carboxy))-(N-(L-Phe)-p-Cyanobenzoessäure)-phenylendiamin **102**

5.0 g (2.5 mMol) Wang (p-Benzyloxybenzylalkohol-Harz) wurden mit einer voraktivierten Lösung aus 3.6 g (70 mMol) Acrylsäure, 25 g (70 mMol) TPTU und 9.0 ml (140 mMol) DIPEA in 50 ml NMP versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt. Danach wurde das Harz gründlich mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

Das Harz wurde in einen 500 ml Rundkolben überführt und mit 5.0 g (60 mMol) 4-Aminoanilin in 250 ml $\text{CH}_3\text{COOH/CH}_2\text{Cl}_2$ 1:1 während 14 h bei 50° C unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde das Harz mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

2.5 g (1.25 mMol) Harz wurden dann mit 1.2 g (ca. 3 mMol) Fmoc-L-Phenylalanin, 750 μl (6 mMol) DIPEA und 890 mg (3 mMol) TPTU versetzt und das RG wurde auf das 1.5 fache des Harzvolumens mit NMP aufgefüllt. Während 2 h wurde das RG bei RT geschüttelt. Nach Waschen mit Isopropanol und NMP wurde das Harz 20 Minuten mit 20 % Piperidinlösung behandelt und wiederum gründlich gewaschen.

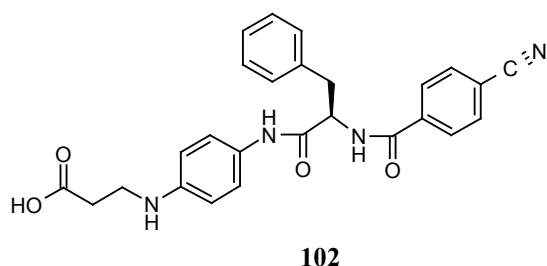
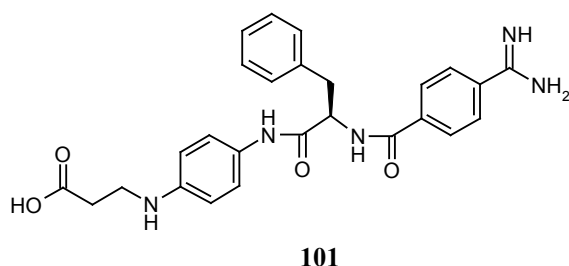
Das Harz wurde mit 330 mg (2 mMol) 4-Amidinobenzoessäure, 500 μl (4 mMol) DIPEA und 600 mg (2 mMol) TPTU versetzt und mit NMP auf das 1.5 fache des Harzvolumens aufgefüllt. Danach wurde es bei RT während 2 h geschüttelt und mit Isopropanol und CH_2Cl_2 ausgiebig gewaschen.

Das Harz wurde während 1 h mit einem Überschuss an 50 % TFA in CH_2Cl_2 behandelt und die saure Lösung abfiltriert. Danach wurde 1 Liter Diethylether zur TFA-Lösung gegeben, die Lösung trübte sich ein wenig, aber es entstand kein Niederschlag.

ISP-MS: pos.: 474 (M+H)⁺ des Amidins **101**, 457 (M+H)⁺ des Nitrils **102**

Daraufhin wurde die Lösung eingengt und mittels FPLC chromatographiert. Die Fraktionen, die alle das Produkt **101** und Nitril **102** enthielten, wurden vereinigt, das LM eingengt und noch einmal gereinigt. Es konnte kein Amidin **101** mehr nachgewiesen werden.

ISP-MS: pos.: 457 (M+H)⁺ **102**



Synthese von 1,4- (N'-Ethyl-(2'-Carboxy))-(N-(L-Thi)-p-Amidinobenzoessäure)-phenylendiamin **104 und 1,4- (N'-Ethyl-(2'-Carboxy))-(N-(L-Thi)-p-Cyanobenzoessäure)-phenylendiamin **105****

5.0 g (2.5 mMol) Wang (p-Benzyloxybenzylalkohol-Harz) wurden mit einer voraktivierten Lösung aus 3.6 g (70 mMol) Acrylsäure, 25 g (70 mMol) TPTU und 9.0 ml (140 mMol) DIPEA in 50 ml NMP versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt. Danach wurde das Harz gründlich mit Isopropanol und CH₂Cl₂ gewaschen.

Das Harz wurde in einen 500 ml Rundkolben überführt und mit 5.0 g (60 mMol) 4-Aminoanilin in 250 ml CH₃COOH/CH₂Cl₂ 1:1 während 14 h bei 50° C unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde das Harz mit Isopropanol und CH₂Cl₂ gewaschen.

2.5 g (1.25 mMol) Harz wurden dann mit 1.2 g (ca. 3 mMol) Fmoc-L-Thienylalanin, 750 µl (6 mMol) DIPEA und 890 mg (3 mMol) TPTU versetzt und das RG wurde auf das 1.5 fache des Harzvolumens mit NMP aufgefüllt. Während 2 h wurde das RG bei RT geschüttelt. Nach Waschen mit Isopropanol und NMP wurde das Harz 20 Minuten mit 20 % Piperidinlösung behandelt und wiederum gründlich gewaschen.

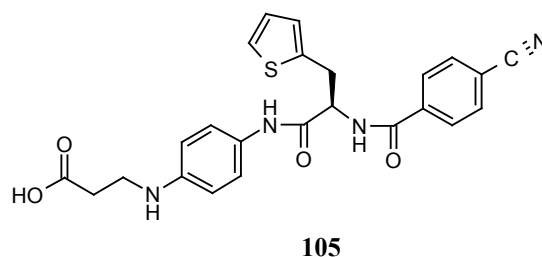
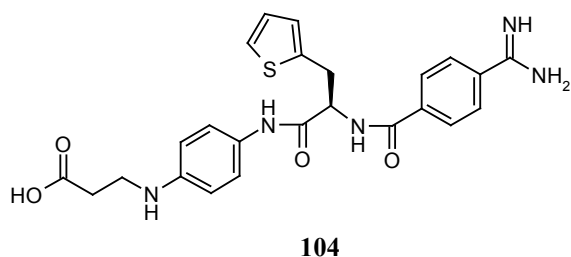
Das Harze wurde mit 330 mg (2 mMol) 4-Amidinobenzoessäure, 500 µl (4 mMol) DIPEA und 600 mg (2 mMol) TPTU versetzt und mit NMP auf das 1.5 fache des Harzvolumens aufgefüllt. Das Harz wurde bei RT während 2 h geschüttelt, danach mit Isopropanol und CH₂Cl₂ ausgiebig gewaschen.

Das Harz wurde während 1 h mit einem Überschuss an 50 % TFA in CH₂Cl₂ behandelt und die saure Lösung abfiltriert. Danach wurde 1 Liter Diethylether zur TFA-Lösung gegeben, die Lösung trübte sich ein wenig, aber es entstand kein Niederschlag.

ISP-MS: neg.: 478 (M+H)⁺ des Amidins **104**, 461 (M+H)⁺ des Nitrils **105**

Daraufhin wurde die Lösung eingengt und mittels FPLC chromatographiert. Die Fraktionen, die alle beide Produkt **104** und **105** enthielten, wurden vereinigt, das LM eingengt und noch einmal gereinigt. Die Fraktion, die im ISP-MS einen intensiven Molpeak ergaben wurden gesammelt und einrotiert. Ausbeute: 20 mg (3.5 m%) braunes viskoses Öl.

ISP-MS: neg.: 461(M+H)⁺ **105**



Synthese von 1,4- (N'-Ethyl-(2'-Amid))-N-(L-Thi)-p-Cyanobenzoesäure)-phenylendiamin **103** und 1,4- (N'-Ethyl-(2'-Amid))-N-(D-Thi)-p-Cyanobenzoesäure)-phenylendiamin **106**

10.0 g (7 mMol) Rink-Amid AM Harz wurden mit einer voraktivierten Lösung aus 3.6 g (70 mMol) Acrylsäure, 25 g (70 mMol) TPTU und 9.0 ml (140 mMol) DIPEA in 50 ml NMP versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt. Danach wurde das Harz mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

Das Harz wurde in einen 500 ml Rundkolben überführt und mit 11.0 g (140 mMol) 4-Aminoanilin in 250 ml $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:1 während 14 h bei 50° C unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde das Harz mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

Je 5 g (3.5 mMol) Harz wurden mit einer voraktivierten Lösung aus einerseits 2.4 g (6 mMol) Fmoc-L-Thienylalanin, andererseits 2.4 g (6 mMol) Fmoc-D-Thienylalanin und 1.8 g (6 mMol) TPTU und 1.5 ml (12 mMol) DIPEA in 10 ml NMP versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt. Danach wurde das Harz mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

Das Harz wurde mit einer 20 % Piperidinlösung während 20 Minuten bei RT behandelt und wiederum mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

Danach wurde das Harz jeweils mit einer voraktivierten Lösung aus 1.1 g (7 mMol) 4-Cyanobenzoesäure, 2.6 g (7 mMol) TPTU und 1.7 ml (14 mMol) DIPEA in 10 ml NMP versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt. Danach wurde das Harz mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

Mit 50 ml einer 50 % TFA Lösung in CH_2Cl_2 wurde das Harz während 1 h behandelt und danach abfiltriert. Durch Zugabe von 1 Liter Diethylether zur sauren Lösung wurde das Produkt ausgefällt. Das Produkt wurde abfiltriert und mittels FPLC über Source-Material gereinigt.

103

IR (cm^{-1}): 3269 (-NH); 2750 ($-\text{N}^+\text{H}$); 2231 (-CN); 1653 (Amid-CO); 1539 (Amid II); 833 (p-disubst. Benzol)

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): Produkt liegt protoniert vor – schlechtes Spektrum, 2.38 (t, -NH- CH_2 - CH_2 -, J = 6.7 Hz, 2 H); 3.3 (m, -NH- CH_2 - CH_2 -, 2 H); 4.85 (m, -, -CO- CHR -NH-, 1H); 6.8 – 8.05 (diverse m., 11H); 9.15 (m, -CHR-NH-CO-, 1H); 9.9 (s, Ar-NH-CO-, 1H)

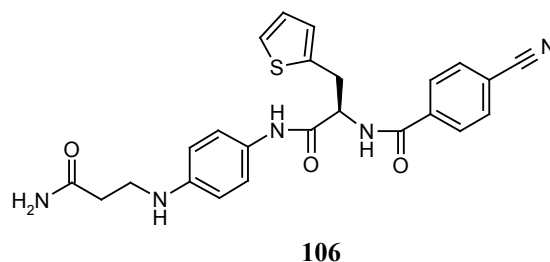
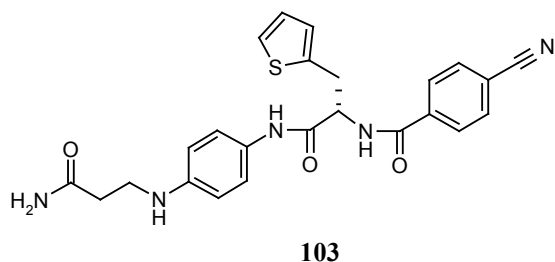
ISP-MS: pos: 462 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 479 ($\text{M}+\text{NH}_4$)⁺

106

IR (cm^{-1}): 3269 (-NH); 2800 ($-\text{N}^+\text{H}$); 2234 (-CN); 1653 (Amid-CO); 1540 (Amid II); 856 (p-disubst. Benzol)

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): 2.5 (m, Ar-NH- CH_2 -m, 2H); 3,3 (t, -CO- CH_2 - CH_2 -, 2H); 4.8 (br, -CO- CHR -NH-, 1H); 5.05 (br, Ar-NH- CH_2 -, 1H); 6.8 – 8.1 (diverse m., 11H); 9.1 (d, -CHR-NH-CO-, J = 8.07 Hz); 10.2 (s, Ar-NH-CO-, 1H)

ISP-MS: pos: 462 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 479 ($\text{M}+\text{NH}_4$)⁺



Synthese von 1,4- (N'-Ethyl-(2'-Amid))-N-(D-Arg)-m-Cyanobenzoesäure)-phenylendiamin 107 und 1,4- (N'-Ethyl-(2'-Amid))-N-(D-Tyr)-m-Cyanobenzoesäure)-phenylendiamin 110

10 g (7 mMol) Rink-Amid AM Harz wurden mit einer voraktivierten Lösung aus 3.6 g (70 mMol) Acrylsäure, 25 g (70 mMol) TPTU und 9.0 ml (140 mMol) DIPEA in 50 ml NMP versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt. Danach wurde das Harz mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

ATR-IR (cm^{-1}): 845 (Vinyl)

Das Harz wurde in einen 500 ml Rundkolben überführt und mit 11.0 g (140 mMol) 4-Aminoanilin in 250 ml $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:1 während 14 h bei 50° C unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde das Harz mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

ATR-IR (cm^{-1}): 845 verschwindet

Je 5 g (3.5 mMol) Harz wurden mit einer voraktivierten Lösung aus 2.4 g (6 mMol) Fmoc-D-Tyrosin, bzw. 2.4 g (6 mMol) Fmoc-D-Arginin und jeweils 1.8 g (6 mMol) TPTU und 1.5 ml (12 mMol) DIPEA in 10 ml NMP versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt. Danach wurde das Harz mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

ATR-IR (cm^{-1}): 1720 (Carbamat); 740, 760 (o-disubst. Aromat)

Das Harz wurde mit einer 20 % Piperidinlösung während 20 Minuten bei RT behandelt und wiederum mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

ATR-IR (cm^{-1}): 1720, 740, 760 verschwinden

Danach wurde das Harz jeweils mit einer voraktivierten Lösung aus 1.1 g (7 mMol) 4-Cyanobenzoesäure, 2.6 g (7 mMol) TPTU und 1.7 ml (14 mMol) DIPEA in 10 ml NMP versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt. Danach wurde das Harz mit Isopropanol und CH_2Cl_2 gewaschen.

IR (cm^{-1}): 2230 (Aryl-CN)

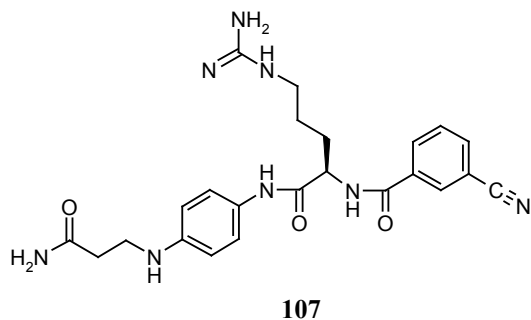
Mit 50 ml einer 50 % TFA Lösung in CH_2Cl_2 wurde während 1 h das Produkt vom Harz abgespalten. Durch Zugabe von Diethylether wurde das Produkt ausgefällt. Das Produkt wurde abfiltriert und mittels FPLC über Source-Material gereinigt.

107

IR (cm⁻¹): 2230 (Aryl-CN); 1640 (Amid I, Guanidin); 1550 (Amid II), 840 (para-subst. Benzol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.1 – 3.1 (Arg-Seitenkette – CH₂); 2.3 (m, Ar-NH-CH₂, 2H); 3.2 (m, CO-CH₂-, 2H); 4.65 (m, Ar-NH-CH₂-, 2H); 6.7 – 8.1 (m, Aryl-H, 12 H); 8.9 (d, Ar-NH-CO-, 1H)

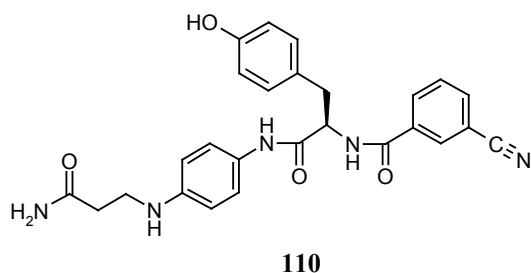
ISP-MS: pos: 465 (M+H)⁺

**110**

IR (cm⁻¹): 2230 (Aryl-CN); 1640 (Amid I); 1555 (Amid II); 840 (para-subst. Benzol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 2.25 (m, Ar-NH-CH₂, 2H); 3.4 (m, CO-CH₂-, 2H); 4.7 (m, Ar-NH-CH₂-, 2H); 6.6 – 7.9 (m, Aryl-H, 12 H); 9.0 (d, Ar-NH-CO-, 1H)

ISP-MS: pos: 472 (M+H)⁺



Synthese von 1,4- (N'-Ethyl-(2'-Carboxy))-(N-(D-Arg)-p-Cyanobenzoessäure)-phenylendiamin 108 und 1,4- (N'-Ethyl-(2'-Carboxy))-(N-(D-Tyr)-p-Cyanobenzoessäure)-phenylendiamin 112

5.0 g (2.5 mMol) Wang (p-Benzyloxybenzylalkohol-Harz) wurden mit einer voraktivierten Lösung aus 3.6 g (70 mMol) Acrylsäure, 25 g (70 mMol) TPTU und 9.0 ml (140 mMol) DIPEA in 50 ml NMP versetzt und während 3 h bei RT geschüttelt. Danach wurde das Harz gründlich mit Isopropanol und CH₂Cl₂ gewaschen.

ATR-IR (cm⁻¹): 845 (Vinyl)

Das Harz wurde in einen 500 ml Rundkolben überführt und mit 11.0 g (140 mMol) 4-Aminoanilin in 250 ml CH₃COOH/CH₂Cl₂ 1:1 während 14 h bei 50° C unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde das Harz mit Isopropanol und und CH₂Cl₂ gewaschen.

ATR-IR (cm⁻¹): 845 verschwindet

Je 2.5 g (1.25 mMol) Harz wurden dann mit jeweils 1.2 g (ca. 3 mMol) Fmoc-D-Arginin bzw. Fmoc-D-Tyrosin, 750 µl (6 mMol) DIPEA und 890 mg (3 mMol) TPTU versetzt und das RG wurde auf das 1.5 fache des Harzvolumens mit NMP aufgefüllt. Während 2 h wurde das RG bei RT geschüttelt. Nach Waschen mit Isopropanol und NMP wurde das Harz 20 Minuten mit 20 % Piperidinlösung behandelt und wiederum gründlich gewaschen.

ATR-IR (cm⁻¹): D-Tyr: 1604, 1650, 1731

ATR-IR (cm⁻¹): D-Arg: 1748, 1726, 1674, 1343, 1261, 925, 888

Die beiden Harze wurden jeweils mit 300 mg (2 mMol) 4-Cyanobenzoesäure, 500 µl (4 mMol) und 600 mg (2 mMol) TPTU versetzt und das Reaktionsgemisch wurde mit NMP auf das 1.5 fache des Harzvolumens aufgefüllt. Das Harz wurde bei RT während 3 h geschüttelt, danach mit Isopropanol und CH₂Cl₂ ausgiebig gewaschen.

ATR-IR (cm⁻¹): D-Tyr: 2220 (-CN)

ATR-IR (cm⁻¹): D-Arg: 2225 (-CN); 1735, 1000 – 800 starke Änderungen

Die beiden Harze wurden während 1 h mit einem Überschuss an 50 % TFA in CH₂Cl₂ behandelt und die saure Lösung abfiltriert. Danach wurde jeweils 1 Liter Diethylether zur TFA-Lösung gegeben und die Produkte wurden ausgefällt. Die Produkte wurden abfiltriert und am HV getrocknet. Die Rohprodukte wurden über Source-Material chromatographisch gereinigt.

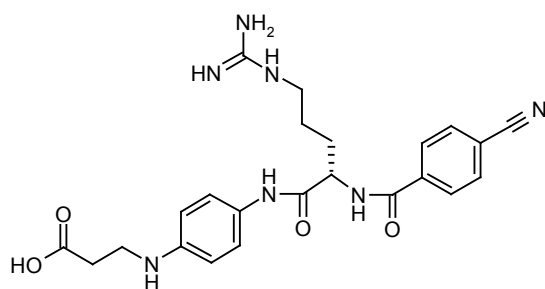
108

Ausbeute: 106 mg (18 %)

ISP-MS: 466 (M+H)⁺

ATR-IR (cm⁻¹): 3338 (-NH); 2232 (-CN); 1636 (Amid-C=O); 1540 (Amid II); 1406 (COO⁻); 1190 (-COOH); 834 (p-disubst. Aromat)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.55 – 1.65 (m, br, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CHR₂, 4H); 2.5 (unter DMSO, -CO-CH₂-CH₂-NH-, 2H); 3.15 (m, -NH-CH₂-CH₂-, 2H); 3.25 (t, CO-CH₂-CH₂-NH-, J = 6.84 Hz, 2H); 4.55 (m, -CHR-NH-CO-, 1H); 7.59 (t, -CH₂-NH-C(=N)-NH₂, 1H); 6.6 (-CH₂-NH-C(CH₂)₂-, J = 8.4 Hz, 2H); 7.1 (br, -C(NH₂)₂⁺, 4H); 7.35 (-CO-NH-C(CH₂)₂-, J = 8.7 Hz, 2H); 7.97 (NC-C(CH₂)₂-, J = 8.49 Hz, 2H); 8.05 (-NH-CO-C(CH₂)₂-, J = 8.46, 2H); 8.85 (d, -CHR-NH-CO-, J = 7.7 Hz, 1H); 9.8 (s, Ar-NH-CO-, 1H)



108

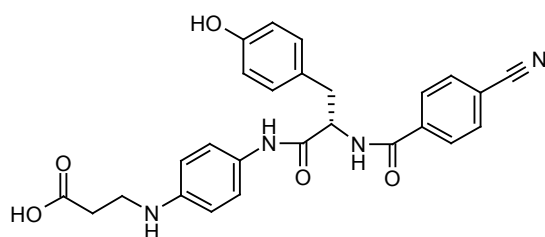
112

Ausbeute: 4 mg (0.7 %)

ISP-MS: 473 (M+H)⁺

ATR-IR (cm⁻¹): 3307 (-NH, -OH); 2232 (-CN); 1715 (-COOH); 1640 (Amid-C=O); 1612, 1407 (-COO⁻); 1540 (Amid II); 1306, 1174, 1018 (Phenol); 824 (p-disubst. Aromat)

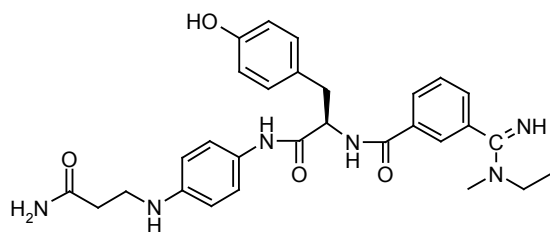
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 2.50 (unter DMSO, -CH₂-CH₂-NH-, 2H); 3.2 (t, -CH₂-CH₂-NH-, J = 6.75 Hz, 2H); 4.7 (m, br, -CO-CH_R-NH-, 1H); 6.5 (d, -CH₂-NH-C(CH₂)₂-, J = 8.85 Hz, 2H); 6.65 (d, HO-C(CH₂)₂-, J = 8.4 Hz, 2H); 7.15 (d, -CH₂-C(CH₂)₂-, J = 8.4 Hz, 2H); 7.3 (d, -CO-NH-C(CH₂)₂-, J = 8.75, 2H); 7.9 – 8.0 (m, Aryl-H des Benzonitrils, 4H); 8.9 (d, -CH_R-NH-CO-, J = 8.1 Hz, 1H); 9.8 (s, Ar-NH-CO-, 1H)

**112**

Synthese von 1,4- (N'-Ethyl-(2'-Amid))-N-(D-Tyr)-m-(N-Ethyl-Methyl)-amidinobenzoessäure)-phenylendiamin 110

30 mg (0.07 mMol) **110** wurden mit 20 mg (0.12 mMol) N-Acetylcystein in 2 ml Ethanol gelöst. Dazu wurden 50 µl (0.85 mMol) N-Methylethylamin zugegeben und während 14 h bei 50° C unter Rückfluss gerührt. Ein ISP-MS des RG zeigt einen minimalen Peak des Produktes. Das RG wurde eingengt und über Source-Material chromatographiert. Die Fraktionen mit dem Produkt wurden eingengt und lyophilisiert. Man erhielt 950 µg (3.2 %) eines hellgelben Pulvers.

ISP-MS: pos: 531 (M+H)⁺

**110**

10. Literaturverzeichnis

- (1) A.F.Horwitz *Spektr. Wiss.* **1998**, *1*, 86-94.
- (2) R.M.Scarborough, D.D.Gretler *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 3453-3473.
- (3) S.Aota, K.M.Yamada *Adv. Exp. Med. Biol* **1997**, *400B*, 669-682.
- (4) R.O.Hynes *Cell* **1992**, *69*, 11-25.
- (5) M.J.Humphries *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 29-32.
- (6) E.F.Plouw, M.D.Pierschbacher, E.Ruoslahti, G.A.Marguerie, M.H.Ginsberg *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1985**, *82*, 8057-8061.
- (7) D.R.Phillips, I.F.Charo, L.V.Parise, L.A. Fitzgerald, Blood, 1988, *71*, 831-843 *Blood* **1988**, *71*, 831-843.
- (8) B.S.Coller *Circulation* **1995**, *92*, 2373-2380.
- (9) B.S.Coller *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 11467-1470.
- (10) R.M.Scarborough *Circulation* **1999**, *100*, 437-444.
- (11) A.T.Nurden *Thromb. Haemost* **1999**, *82*, 468-480.
- (12) E.F. Plow, M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, G.A.Marguerie, M.H.Ginsberg *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 8057-8061.
- (13) D.R.Phillips, I.F.Charo, L.V.Parise, L.A. Fitzgerald *Blood* **1988**, *71*, 831-843.
- (14) S.Jackson, W.DeGrado, A.Dwivedi, A.Rockwell, R.Harlow *J.Am.Chem.Soc* **1994**, *116*, 3220.
- (15) S.E.D'Souza, M.H.Ginsberg, T.A.Burke, E.F.Plouw *J.Bio.Chem.* **1990**, *265*, 3440.
- (16) W.Huber, J.Hurst, D.Schlatter, R.Barner, J.Hübscher, B.Steiner *Eur.J.Biochem.* **1995**, *227*, 1787.
- (17) J.Williams, N.Ruegg, A.Birch, C.Weber, J.A.Robinson, D.Schlatter, W.Huber *Biochemistry* **1995**, *34*, 1787.
- (18) D.R.Phillips, I.F.Charo, L.V.Parise, L.A.Fitzgerald *Bloo* **1988**, *71*, 831-843.
- (19) T.F.Huang, J.C.Holt, E.P.Kirby, S.Niewiarowski *Biochemistry* **1989**, *28*, 661-666.
- (20) R.J.Gould, M.A.Polokoff, P.A.Friedmann, T.F.Huang, J.C.Holt, J.J.Cook, S.Niewiarowski *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1990**, *195*, 168-171.
- (21) R.M.Scarborough *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 1058-1065.
- (22) M.A. McLane, C.Marcinkiewicz et. al *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1998**, *219*, 109-119.
- (23) P.S. Wright, V. Saudek, T.J. Owen, S.L. Harbeson, A.J. Bitonti *Biochem. J* **1993**, *293 (Pt 1)*, 263-267.
- (24) Horwitz, Alan F. In *Spektrum der Wissenschaft*, **1998**; Vol. Januar 1; pp 86-94.
- (25) C.A.Janeway, P.Travers *Immunologie*; 2.Auflage ed.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 1997.
- (26) Merrifield, R.B. *J. Am. Chem. Soc* **1963**, *85*, 2149.
- (27) E.Bayer *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 117.
- (28) A.Dömling, I.Ugi *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3168-3210.
- (29) T.Curtius *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1902**, *35*, 3226.
- (30) N.Fujii, H.Yajima *J. Chem. Soc. Perkin I* **1981**, 789, 797, 804, 811, 819, 831.
- (31) E.Wünsch *Synthese von Peptiden*; Houben-Weyl, Thieme: Stuttgart, 1974; Vol. XV2.
- (32) M.Bodanszky *Ann NY Acad Sci* **1960**, *88*, 655.
- (33) G.Kupryszewski *Chem. Abstr.* **1961**, *56*, 6081.
- (34) J.Kovacs, L.Kisfaludy, MQ.Ceprini *J. Amer. Chem. Soc* **1967**, *89*, 183.
- (35) G.W.Anderson, J.E.Zimmermann, F.M.Callahan *J. Amer. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3039.
- (36) J.C.Sheehan, G.P.Hess *J. Amer. Chem. Soc.* **1955**, *77*.
- (37) J.C.Sheehan, J.J.Hlavka *J. Org. Chem.* **1956**, *21*, 439.

- (38) J.C.Sheehan, P.A.Cruickshank, G.L.Boshart *J. Org. Chem.* **1961**, 26.
- (39) L.A.Carpino *Chem. Commun.* **1994**, 201.
- (40) B.Castro *Tetrahedron Letters* **1975**, 1219.
- (41) G.A.Grant *Synthetic Peptides: A User's Guide*; **W.H. Freeman & Co.**: New York, **1992**.
- (42) M.Bodanszky *Principles of Peptide Synthesis*; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 1993.
- (43) Merrifield, R.B. *Angew. Chem* **1985**, 10, 801.
- (44) L.A.Carpino *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 98.
- (45) M. Bergman, L. Zervas *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1932**, 65, 1192.
- (46) L. A. Carpino, G.Y. Han *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 5748.
- (47) J.Jones *Amino Acid And Peptide Synthesis*; Oxford University Press: Oxford, 1997; Vol. 7.
- (48) C.D.Chang, M.Waki, M.Ahmad, M.Meienhofer, E.O. Lundell, J.D.Haug *Int. J. Pept. Protein Res.* **1980**, 15, 59.
- (49) H. Yajima, N. Fujii, S. Funakoshi, T. Watanabe, E. Murayama, A. Otaka *Tetrahedron* **1988**, 44, 805.
- (50) P.J.Belshaw, S.Mzengeza, G.A.Lajoie *Synth. Commun.* **1990**, 20, 3157.
- (51) K. Barlos, D. Papaioannou, D. Theodopoulos *J. Org. Chem* **1982**, 47, 1324.
- (52) R.Ramage, J.Green *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2287.
- (53) H.M. Geysen, S.J. Rodda, T.J.A. Mason *Mol. Immunol.* **1986**, 23, 709.
- (54) Frank, R. *Tetrahedron* **1992**, 48, 9217-9232.
- (55) D.Scharn, H.Wenschuh, U.Reineke, J.Schneider-Mergener, L.Germeroth *J. Comb. Chem.* **2000**, 2, 361-369.
- (56) U. Reineke, A. Kramer, J. Schneider-Mergener, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1999**.
- (57) N. Heveker, M. Montes, L. Gereroth, A.Amara, A. Trautmann, M. Alizon, J. Schneider-Mergener *Curr. Biol.* **1998**, 8, 369.
- (58) A.Furka, F.Sebestyen, M.Asgedum, G.Dibo *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 37, 487.
- (59) K.S.Lam, S.E.Salmon, E.M.Hersh, V.J.Hruby, W.M.Kazmierski, R.J.Knapp *Nature* **1991**, 354, 82-84.
- (60) K.S.Lam, M.Labl *Immunomethods* **1992**, 1, 11-15.
- (61) K.S.Lam, V.J.Hruby, M.Labl, R.J.Knapp, W.M. Kazmierski, E.M.Hersh, S.E.Salmon *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 419-424.
- (62) M.C.Needels, D.G.Jones, E.H.Tate, G.L.Heinkel, L.M.Kochersperger, W.J.Dower, R.W.Barrett, M.A.Gallo *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 10700-10704.
- (63) M.Meldal, I.Svendsen, K.Breddam *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 3314-3318.
- (64) A.Kassarjian, V.Schellenberger, C.W.Turck *Peptide Res.* **1993**, 6, 129-133.
- (65) G.Fassina, M.R.Bellitti, G.Cassani *Protein Peptide Lett.* **1994**, 1, 15-18.
- (66) M.Labl, V. Krchnak, N.F. Sepetov, B. Seligmann, P. Strop, S. Felder, Selectide Corporation, K. S. Lam *Biopolymers (Peptide Science)* **1995**, 37, 177-198.
- (67) K.S.Lam, M.Labl *Methods; A Companion to Methods in Enzymology* **1994**, 6, 372-380.
- (68) V. Nikolaiev, A. Stierandova, V. Krchnak, B. Seligmann, K.S.Lam, S.E. Salmon, M. Labl *Pept. Res.* **1993**, 6, 161.
- (69) J.M. Kerr, S.C. Banville, R.N. Zuckermann *J. Am. Chem. Soc* **1993**, 115, 2529.
- (70) J. Nielsen, S. Brenner, K.D. Janda *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9812.
- (71) M.C. Needels, D.G. Jones, E.H. Tate, G.L. Heinkel, L.M. Kochersperger, W.J. Dower, R.W. Barrett, M.A. Gallo *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 10700.
- (72) A.Borchert, W.C.Still *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 373.
- (73) H.P. Nestler, P.A. Bartlett, W.C. Still *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 4723.
- (74) K.C. Nicolaou, X.-Y. Xiao, Z.Parandoosh, A. Senyei, M.P. Nova *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2476.
- (75) E.J.Moran, S.Sarhar, J.F.Cargill, M.M.Shahbaz, A.Lio, A.M.M.Mjalli, R.W.Armstrong *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 10787-10788.

- (76) A.Furka, J.W.Christensen, E.Healy, H.R.Tanner, H.Saneii *J.Comb.Chem.* **2000**, 2, 220-223.
- (77) S.P.A.Fodor, J.L.Read, M.C.Pirrung, L.Stryer, A.T.Lu, D.Solas *Science* **1991**, 251, 767.
- (78) Smioth, G.P. *Science* **1985**, 228, 1315.
- (79) S.E.Cwirla, E.A.Peters, R.W.Barrett, W.J.Dower *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 6378-6382.
- (80) J.K.Scott, G.P.Smith *Science* **1990**, 249, 386-390.
- (81) J.J. Devlin, L.C. Panganiban, P.E. Devlin *Science* **1990**, 249, 404-406.
- (82) M.C. Fitzgerald, K. Harris, C.G. Shevlin, G. Siuzdak *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 979-982.
- (83) G.Siuzdak, J.K.Lewis *Biotechn. And Bioeng. (Comb. Chem.)* **1998**, 61, 2.
- (84) Harick, N.J. *Internal Reflection Spectroscopy*; Interscience Publ.: New York, 1967.
- (85) W.Gottwald, G.Wachtel *IR-Spektroskopie für Anwender*; Wiley VCH, 1997.
- (86) A.Detken, M.Ernst, B.H.Meier *Chimia* **2001**, 844-851.
- (87) P.Edman *Acta Chem. Scand.* **1950**, 4, 283.
- (88) G.Begg, P.Edman *Eur.J.Biochem.* **1967**, 1, 80.
- (89) R.A.Laursen *Methods Biochem. Anal.* **1980**, 26, 201.
- (90) W.P.Jencks *Catalysis in Chemistry and Enzymology*; McGraw-Hill: New York, 1969.
- (91) K.M.Shokat, P.G.Schultz *Annu. Rev. Immunol.* **1990**, 8, 335-363.
- (92) L.Pauling *Am. Sci.* **1948**, 36, 51-58.
- (93) A.Tramontano, K.D.Janda, R.A.Lerner *Science* **1986**, 234, 1566-1570.
- (94) K.Ehud, R.A.Lerner *Israel Journal of Chemistry* **1996**, 36, 113-119.
- (95) G.Wulff *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1812.
- (96) K.Mosbach, O.Ramström *Bio/Technology* **1996**, 14, 163.
- (97) K.Haupt, K.Mosbach *Chem. Rev* **2000**, 100, 2495.
- (98) L.Alig, A.Edenhofer, P.Hadvary *J.Med.Chem.* **1992**, 35, 4393-4407.
- (99) M.Manneberg, PRPG, Interne Mitteilung an Dr. B. Steiner , 4.9.1995.
- (100) www.probes.com .
- (101) Polymer Laboratories Product Bulletin, PL-PEGA .
- (102) M.Otto *Analytische Chemie*; VCH Chemie: Weinheim, 1995.
- (103) H.Schütz *Pharmacie In Unserer Zeit* **1999**, 28, 320-328.
- (104) J.Osborn In *Live Science News*; Amersham Pharmacia Biotech, 2001; Vol. March 2001.
- (105) L.W.Runnels, S.F.Scarlata *J.Biophys.* **1995**, 69, 1569-1583.
- (106) E.D.Matayoshi, G.T.Wang, G.A.Krafft, J.Erickson *Science* **1990**, 247, 954-958.
- (107) G.Rosse, E.Kueng, M.G.Page, V.Schauer-Vukasinovic, T.Giller, H.W.Lahm, P.Hunziker, D.Schlatter *J.Comb.Chem.* **2000**, 2, 461-466.
- (108) S. Tyagi, D.P.Bratu, F.R.Kramer *Nat.Biotechnol.* **1998**, 16, 49-53.
- (109) S.Tyagi, F.R.Kramer *Nat.Biotechnol.* **1996**, 14, 303-308.
- (110) W.Berger, H.Prinz, J.Striessnig *Biochemistry* **1994**, 33, 11875-11883.
- (111) L.E.Morrison *Anal. Biochem.* **1988**, 174, 101-120.
- (112) J.Ju, C.Ruan, C.W.Fuller, A.N.Glazer, R.A.Mathies *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1995**, 92, 4347.
- (113) E.L.Pechaur, I.Martin *Biochemistry* **1998**, 37, 2361-2371.
- (114) M.A.Partearroyo, E.Cabazon, J.L.Nieva, A.Alonso, F.M.Goni *Biophys.Acta* **1994**, 1189, 175-180.
- (115) S.H. Chen, C.F. Frank *Langmuir* **1989**, 5, 978.
- (116) J.Am. Chem. Soc. 2000, 122, 11270-11271 *J.Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11270-11271.
- (117) C.A.Guy, G.B.Fields *Methods Enzymol.* **1997**, 289, 5.
- (118) H.Zbinden , 1999.
- (119) M.C.Fitzgerald, K.Harris, C.G.Shevlin, G.Siuzdak *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1996**, 6, 979-982.

- (120) C.P.Holmes *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2370-2380.
- (121) R.Rodebaugh, B.Fraser-Reid, H.M.Geysen *Tetrahedron Letters* **1997**, 3, 7653-7656.
- (122) D.H.Rich, S.K.Gurwara *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 610-611.
- (123) D. H. Rich, S. K. Gurwara *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 1575-1579.
- (124) K.F.Blom, A.P.Combs, A.L.Rockwell, K.R.Oldenburg, J.Zhang, T.chen *Rapid Comm. in Mass Spectr.* **1998**, 12, 1192-1198.
- (125) O.Lack, H.Zbinden, W.-D.Woggon *Helvetica Chimica Acta* **2002**, 85, 495-501.
- (126) W. Bannwarth, J. Wippler *Helv. Chim. Acta* **1990**, 73, 1139-1147.
- (127) W.Bannwarth *mündliche Mitteilung* .
- (128) S.S.Nikam, B.E.Kornberg, M.F.Rafferty *J.Org.Chem.* **1997**, 62.
- (129) Y.Ukaji, K.Yamamoto, M.Fukui, T.Fujisawa *Tetrahedron Letters* **1991**, 32, 2919-2922.
- (130) Catalog, NovaBiochem In *General method for iodine oxidation*, 1999; pp 60.
- (131) M.Kakiuchi, Y.Izuno, M.Maeda *Chem.Pharm.Bull.* **1996**, 44, 1107-1110.
- (132) J.A.Camarero, E.Giralt, D.Andreu *Tetrahedron Letters* **1995**, 1137-1140.
- (133) H.Firouzabadi, N.Iranpoor, M.A.Zolfigol *Synth.Comm.* **1998**, 28, 1179-1185.
- (134) H.Suzuki, S.Kawato, A.Nasu *Bull.Chem.Soc.Jpn.* **1992**, 65, 626-627.
- (135) Schobel, U. *Bioconjugate Chemistry*, 1999; Vol. 10.
- (136) E.J.Corey, M.M.Mehrotra *Tetrahedron Letters* **1988**, 29, 57-60.
- (137) M.Bradley, S.Lebreton, S.Monaghan *Aldrichimica Acta* **2001**, 34, 75-83.
- (138) Millipore *Technical Note* , www.millipore.com/ziptip.
- (139) D.W.Hobbs, T.Guo In *Library Design Concepts and Implementation Strategies*; A.K.Ghose, V. N. V., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, Basel, 2001.
- (140) T.Weller, L.Alig *J.Med.Chem.* **1996**, 39, 3139-3147.
- (141) Udo. E. W. Lange, B. Schäfer, D. Baucke, E. Buschmann, H. Mack *Tetrahedron Letters* **1999**, 40, 7067-7071.
- (142) R.S.Garigipati *Tetrahedron Letters* **1990**, 31, 1969.
- (143) J.I.Levin, E.Turos, S.M.Weinreb *Synthetic Communications* **1982**, 12, 989-993.
- (144) G.Wagner, I.Wunderlich *Pharmazie* **1977**, 32, 76-79.
- (145) R.T.Boéré, R.T.Aakley, R.W.Reed *Journal of Organometallic Chemistry* **1987**, 331, 161-167.
- (146) R.T.Boere, R.T. Oakley, R.W.Reed *J.Organomet.Chem.* **1987**, 331, 161-167.
- (147) M.Miura, T.Tsuda, T.Satoh, M.Nomura *Chem. Lett* **1997**, 11, 1103-1104.
- (148) T.Hosokawa, T.Ohta, S.Murahashi *J.Chem.Soc., Chem. Commun.* **1983**, 948.
- (149) F.Brogli, G.Kalin , US 5177247.
- (150) B.Simono, G.Rousseau *Synthetic Communications* **1993**, 23, 549-560.
- (151) T.Mikami, T.Iwaoka, M.Kato, H.Watanabe, N.Kubodera *Synthetic Communications* **1997**, 27, 2363-2369.
- (152) K.Schwetlick *Organikum*; Deutscher Verlag der Wissenschaften ed.; Barth Verlagsgesellschaft mbH: Leipzig, 1993.
- (153) A.Zilkha, J.Rivlin *J.Org.Chem.* **1958**, 23, 94.
- (154) J.Cabral, P.Laszlo, L.Mahé, M.-T.Montaufer, S.L.Randriamahefa *Tetrahedron Letters* **1989**, 30, 3969-3972.
- (155) P.Dodey, M.Bondoux, K.Ou, M.Barth, P.Houziaux .
- (156) www.merck.com .